COUNTWAY LIBRARY
HC 6EB5

Harvard Medical School

Bowditch Library

Purchased

Harvard Medical Library
in the Francis A. Countway
Library of Medicine ~ Boston

VERITATEM PER MEDICINAM QUÆRAMUS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/naunyn-schmiedebergs-archives-of-pharmacology_1940_194

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

UND

PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. KREHL † UND DR. W. STRAUB
EMER. PROF. DER SPEZIELLEN PATHOLOGIE UND THERAPIE IN HEIDELBERG
PROF. DER PHARMAKOLOGIE IN MÜNCHEN

194. BAND

MIT 204 ZUM TEIL FARBIGEN TEXTABBILDUNGEN

BERLIN
VERLAG VON F. C. W. VOGEL
1940

HARVARD UNIVERSITY
SCHOOL OF MEDICINE AND PUBLIC HEALTH
LIBRARY
Purchase
C 41

Printed in Germany

3855
8-6

Inhalt des 194. Bandes.

Seite

Amann, August, Über die Resorption von Ferrosalzen, speziell des Ferrobicarbonats 277

Amann, August s. W. Straub.

Arnold, O. und **Hamperl, H.,** Untersuchungen zur Toxikologie des 4, 4′-Dioxy-α, β-Diäthylstilbens. Mit 2 Textabbildungen 121

Behrens, Behrend und **Malorny, Günther,** Brecherregende Substanzen im Kaffee und ihre Bedeutung für die Unverträglichkeit des Kaffeegetränkes. Mit 1 Textabbildung 369

Berichtigung 268

Berichtigung 368

Brock, Norbert, Druckrey, H. und **Herken, H.,** Oxalatwirkung und Calcium. Mit 4 Textabbildungen 165

Bucher, K. und **Staub, H.,** Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Leukopenie und Leukocytose nach intravenöser Glykogenzufuhr. IX. Mitteilung über Blutglykogen. Mit 5 Textabbildungen..... 506

Christlieb, Mathilde, Über den Abbau von Oxytocin und Vasopressin in vitro. Mit 2 Textabbildungen 44

Dorow, H. s. A. Krautwald.

Druckrey, H. s. Norbert Brock und H. Herken.

Dybing, Ottar und **Holzhausen, Hans Georg,** Über die Bindung von Digitalisstoffen an die Eiweißfraktionen von Herz- und Skeletmuskel 248

Eichler, Oskar und **Smiatek, Arnold,** Versuche zur Auswertung von Mitteln zur Bekämpfung des Reizhustens. Mit 9 Textabbildungen. 621

Essen, K. W. und **Rogge, Kurt,** Über die pharmakologische Beeinflussung des galvanischen Hautreflexes. Mit 5 Textabbildungen..... 527

Frühfahrt, L., Über den Einfluß der akuten Sublimatvergiftung auf den Hormongehalt des Hypophysenhinterlappens 174

Gotsev, T., Die Bedeutung der Blutgefäße und des Herzens für die Regulierung des Blutdruckes. I. Mitteilung. Mit 4 Textabbildungen.. 31

Seite

Gotsev, T., Die Bedeutung der Blutgefäße und des Herzens für die Regulierung des Blutdruckes. II. Mitteilung: Veritol. Wirkung auf die Blutgefäße, das Herz und den Blutdruck. Mit 5 Textabbildungen 109

Gotsev, T., Die Bedeutung der Blutgefäße und des Herzens für die Regulierung des Blutdruckes. III. Mitteilung: Ephedrin. Wirkung auf die Blutgefäße, das Herz und den Blutdruck. Mit 6 Textabbildungen 596

Gremels, Hans, Über die Beziehungen des Kohlehydratstoffwechsels zur Physiologie und Pharmakologie der Herzenergetik. Mit 12 Textabbildungen 629

Haarmann, W., Hagemeier, A. und **Lendle, L.,** Über die Bindung von Digitalisglykosiden und Digitaloiden an die Eiweißstoffe des Blutserums 205

Haarmann, W., Korfmacher, K. und **Lendle, L.,** Bedingungen der Bindung von Digitalisglykosiden an die Serumeiweißstoffe 229

Hahn, Fritz, Änderungen im Glykogengehalt des Herzens als Zeichen kumulativer Digitaliswirkung 62

Hagemeier, A., Stufenphotometrische Bestimmungen verschiedener herzwirksamer Glykoside und Genine und Beurteilung ihres Reinheitsgrades 195

Hagemeier, A. s. W. Haarmann und L. Lendle.

Hamperl, H. s. O. Arnold.

Hau, Anna-Katharina, Albucid-Bilanzversuche bei internen Krankheitszuständen auf Grund des photometrischen Nachweises von Albucid in Körperflüssigkeiten und Exkreten. Mit 4 Textabbildungen.... 52

Herken, H. s. Norbert Brock und H. Druckrey.

Heubner, Wolfgang und **Schreiber, Emma,** Versuche über chemische Zellreizung an Fibroblastenkulturen. I. Mitteilung: Uabain. Mit 8 Textabbildungen 78

Heubner, Wolfgang und **Schreiber, Emma,** Versuche über chemische Zellreizung an Fibroblastenkulturen. II. Mitteilung: Kupfersalz. Mit 3 Textabbildungen 98

Heubner, Wolfgang und **Schreiber, Emma,** Versuche über chemische Zellreizung an Fibroblastenkulturen. III. Mitteilung: Histamin. Mit 2 Textabbildungen 105

Heubner, W., Berichtigung 132

Hohlweg, Walter, Der Follikelhormongehalt der Progynondragées. Eine Erklärung zur Arbeit von W. Koll und F. Külz in Bd. 193, Seite 506 129

Holzhausen, Hans Georg, Untersuchungen über die Viskositätsbeeinflussung von Muskeleiweißstoffen durch Digitalisglykoside..... 260

Seite

Holzhausen, Hans Georg s. Ottar Dybing.

Hübschmann, Heinrich s. Willi Riecheit.

Jeney, A. v. und **Vályi-Nagy, T.**, Antiheparin-Faktor in der Leber 701

Jeney, A. v., Vályi-Nagy, T., Váczi, L. und **Mihalik, St.**, Die Wirkung des Quercitrins auf den Ruhewert der Blutmilchsäure bei Hunden. Quercitrin-1 :2 :4 α Dinitrophenol-Antagonismus 718

Jung, Fritz, Über das sogenannte Sulfhämoglobin. Mit 6 Textabbildungen 16

Kanda, Zengo s. W. Straub und Fritz Zinnitz.

Kaulla, Kurt Nikolai von, Die Entgiftung des Digitoxins bei der weißen Ratte 179

Kohl, Hans, Über kristallinisches Insulin. XII. Mitteilung: Das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft (IZK) des Blutes beim Diabetes mellitus. Mit 1 Textabbildung 452

Kohl, H., Rössel, W. und **Schipper, F.**, Über kristallinisches Insulin. XIII. Mitteilung: Untersuchungen über das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft (IZK) des Blutes bei verschiedenen Krankheitszuständen (Carcinom, Hypertonie, Lebercirrhose, Lungentuberkulose, Nieren- und Schilddrüsenerkrankungen 461

Koll, W. und **Külz, F.**, Zur Frage des Follikelhormongehalts der Prodragées. Eine Erwiderung auf die Erklärung von Walter Hohlweg in Bd. 193, Seite 129 265

Korfmacher, K., Über die Bedeutung der Wasserlöslichkeit von Geninen und Glykosiden aus der Gruppe des Digitoxins und k-Strophantins für ihre Adsorptionsfähigkeit 217

Korfmacher, K. s. W. Haarmann und L. Lendle.

Krautwald, A. und **Dorow, H.**, Über die Verträglichkeit größerer intravenöser Natriumcitratgaben 691

Külz, F. s. W. Koll.

Laubender, Walther und **Mertz, Bodo**, Die Abhängigkeit der Acetylcholinwirkung am isolierten Meerschweinchenuterus von Konzentration und Reaktionstemperatur. Mit 10 Textabbildungen 389

Lendle, L., Zur Frage der Entstehung der toxischen Digitaliskumulation 493

Lendle, L. s. W. Haarmann und A. Hagemeier.

Lendle, L. s. W. Haarmann und K. Korfmacher.

Malorny, Günther s. Behrend Behrens.

Marsovszky jun., Dr. Paul v., Beitrag zum Mechanismus der blutdrucksteigernden Wirkung des Hypophysenhinterlappenhormons 473

Mertz, Bodo s. Walther Laubender.

Seite

Mihalik, St. s. A. v. Jeney, T. Vályi-Nagy und L. Váczi.

Müller, E. A., Eine neue Methode der Dauerinfusion. Mit 2 Textabbildungen 426

Never, Henry E. s. Erich Vincke.

Oelkers, H.-A., Vergleichende Untersuchungen über die Wirkungsstärke des Morphins und seiner Derivate. I. Mitteilung. Mit 2 Textabbildungen 296

Oelkers, H.-A., Zur Wirkungsweise seltener Erden. Mit 3 Textabbildungen 477

Richter, Georg s. Hubert Vollmer.

Richter, H., Über die Wirkung von Oxydantien (Kaliumpermanganat, Benzoesäureperoxyd, Chinon), Veratrin und Mistel auf die Dynamik des Froschherzens. Mit 3 Textabbildungen 362

Riechert, Willi und **Hübschmann, Heinrich,** Versuche mit Aneurinester am Blutegel, Rattendarm und am Blutdruck der Katze. Mit 3 Textabbildungen 539

Riechert, Willi, Weitere Blutdruckversuche an der Katze mit Acetylaneurin und Benzoylaneurin. Mit 1 Textabbildung 546

Riedel, H., Zur Biologie des 2, 4-Diaminoazobenzols. Beobachtungen über das chemische Verhalten des Azorhodans. Mit 3 Textabbildungen... 190

Riedel, H., Zur Biologie des 2, 4-Diaminoazobenzols. II. Mitteilung: Über die bakterizide Wirkung und einige andere Eigenschaften des Azorhodans..... 613

Rietschel, H. G., Nachtrag zu der Arbeit: Zur Frage der Tachyphylaxie 620

Riml, O., Über die Herkunft stofflicher Blutveränderungen bei Nebenniereninsuffizienz 284

Rocha e Silva, M., Beiträge zur Pharmakologie des Trypsins. I. Wirkung des Trypsins auf die glatten Muskeln des Dünndarms und die Gebärmutter von Säugetieren. Die Freisetzung von Histamin nach Durchströmung der Meerschweinchenlunge mit Trypsin. Mit 15 Textabbildungen 335

Rocha e Silva, M., Beiträge zur Pharmakologie des Trypsins. II. Wirkung des Trypsins auf den Blutkreislauf bei Katze, Kaninchen und Hund. Mit 8 Textabbildungen 351

Rodewald, W., Die Bedeutung der Verbindung Hypophyse—Zwischenhirn für die Melanophorenhormonausschüttung durch Porphyrin 74

Rodewald, W., Über die oestrogene Wirkung von Porphyrinen..... 76

Rössel, W. s. H. Kohl und F. Schipper.

Rogge, Kurt s. K. W. Essen.

Seite

Schipper, F. s. H. Kohl und W. Rössel.

Schreiber, Emma s. Wolfgang Heubner.

Schroeder, Wilhelm, Der Einfluß schwacher Gleichströme auf die Azetylcholinwirkung am isolierten Froschherz. Mit 3 Textabbildungen 589

Schuster-Woldan, E., Über die individuelle Empfindlichkeit von Lebistes reticulatus gegenüber Nikotinlösungen verschiedener Konzentrationen. Mit 5 Textabbildungen 156

Simon, Alexander, Über die Pharmakologie der gefäßverengernden Stoffe der Blutseren. III. Herstellung wirksamer Extrakte aus Katzenserum und einige Eigenschaften derselben. Mit 4 Textabbildungen 725

Smiatek, Arnold s. Oskar Eichler.

Staub, H. s. K. Bucher.

Stefánsson, Kristinn s. W. Straub.

Stelzer, S., Die Bestimmung des Prontosil solubile im Vollblut und Blutplasma nach seiner Isolierung mittels der chromatographischen Adsorptionsanalyse. Mit 17 Textabbildungen 133

Straub, W., Kanda, Zengo und **Zinnitz, Fritz,** Ein Umrechnungsfaktor von gefundenem Meerschweinchentiter auf gesuchten Froschtiter in der Auswertung von Digitalisdrogen. Mit 1 Textabbildung 1

Straub, W. und **Stefánsson, Kristinn,** Über akute Ferro-Eisenwirkungen. Mit 6 Textabbildungen 269

Straub, W. und **Amann, August,** Nikotin und die Diätetik des Tabakrauchens. Mit 10 Textabbildungen 429

Váczi, L. s. A. v. Jeney, T. Vályi-Nagy und St. Mihalik.

Vályi-Nagy, T. s. A. v. Jeney.

Vályi-Nagy, T. s. A. v. Jeney, L. Váczi und St. Mihalik.

Vincke, Erich und **Never, Henry E.,** Über die thromboseverhütende Wirkung des Neodymacetats. Mit 3 Textabbildungen 308

Vogeler, Günther, Über den Komplex: Ferro-Eisen/Adrenalin. Mit 3 Textabbildungen 281

Vollmer, Hubert, Über die Wirkung einmaliger Coffeininjektionen auf Mineralausscheidung und Harnmenge. Mit 6 Textabbildungen... 551

Vollmer, Hubert und **Richter, Georg,** Versuche an coffeingewöhnten Ratten über die Wirkung des Coffeins auf Mineralausscheidung und Harnmenge. Mit 1 Textabbildung 573

Seite

Zinnitz, Fritz, Die Beziehung von Vaguswirkung und Blutdruck über die Steuerung des Potentialwirkungsmechanismus des Acetylcholins durch die Esterase. Mit 11 Textabbildungen 316

Zinnitz, Fritz, Die Beeinflussung der Cholinesterase des Blutserums durch Cholesterin. Mit 5 Textabbildungen 440

Zinnitz, Fritz s. W. Straub und Zengo Kanda.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Ein Umrechnungsfaktor von gefundenem Meerschweinchentiter auf gesuchten Froschtiter in der Auswertung von Digitalisdrogen.

Von

W. Straub, Zengo Kanda und Fritz Zinnitz *.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. Juni 1939.)

Die in Deutschland übliche Auswertung von Digitalisdrogen an Fröschen hat allerlei Unbequemlichkeiten und Nachteile an sich. Sie ist zunächst zeitraubend, denn eine Bestimmung verlangt mindestens 24 Stunden Beobachtungszeit. Dabei verbraucht sie ziemlich viel Tiermaterial und ist, mindestens nach den Münchener Erfahrungen, an die Jahreszeit gebunden, denn die Temporarien sind nur brauchbar, wenn sie aus den Überwinterungslöchern nach Eintritt der Kälte gefangen werden. Die optimale Zeit für Auswertungen ist praktisch höchstens 4—5 Monate.

Wir haben versucht, das von Knaffl-Lenz[1] vorgeschlagene Versuchstier, das Meerschweinchen, heranzuziehen. A priori hat das Meerschweinchen den Vorzug, als gezüchtetes Tier das ganze Jahr über in voraussichtlich gleicher Qualität zur Verfügung zu stehen. Ferner arbeitet die Knaffl-Lenzsche Methode rascher. Eine Messung ist im Durchschnitt mit 5 Meerschweinchen vollendet.

Knaffl-Lenz schreibt bekanntlich vor, den Meerschweinchen nach dem Vorgang von Hatcher die zu prüfende Digitalislösung intravenös zu infundieren, und den Moment des Todes festzustellen. Dazu wird schließlich der Thorax eröffnet, was künstliche Respiration unvermeidlich macht.

Wir haben versucht, die Knaffl-Lenzsche Methode auf ein Minimum von operativen Eingriffen zu reduzieren. Zunächst mußten wir uns aber vergewissern, daß die Infusion von Digitalisinfus in die Jugularvene des Meerschweinchens tatsächlich dasselbe Endresultat hat, wie es bekannt ist von der Hatcher-Methode bei Katzen, d. h. ein völlig scharfer Moment des Herztodes. Wir (K.) haben daher zunächst orientierende Blutdruckversuche

* Die Anregung zu diesen Untersuchungen stammt von W. Straub. Die erste Bearbeitung wurde von Z. Kanda durchgeführt. Nach dessen Abreise nach Japan ergab sich die Notwendigkeit, die Methoden zu vereinheitlichen. Dies wurde von F. Zinnitz besorgt, von dem sämtliche Meerschweinchenwerte dieser Mitteilung stammen. Die Extraktherstellung aus den Drogen, sowie deren genauen Froschtiter verdanken wir E. Triendl.

[1] J. Pharmacol. (Am.) **29**, 407 (1926).

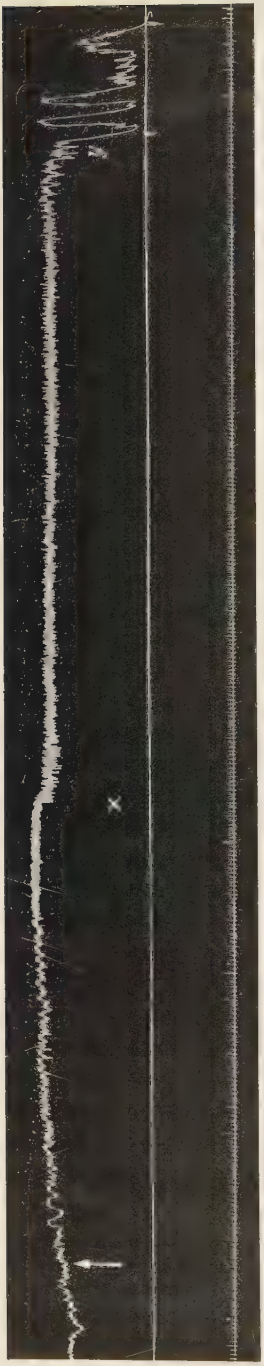


Abb. 1. Infusion von Digitalisinfus am Meerschweinchen. Bei x Vergiftungssymptome, bei y Tod. Dieser Moment ist auch im Elektrokardiogramm scharf zu sehen.

bei langsamer Infusion von Digitalisinfus am Meerschweinchen gemacht. Es hat sich gezeigt, daß unter Registrierung des Blutdrucks der Tod tatsächlich ein reiner und ganz kritischer Herztod ist. Wie die Abb. 1 zeigt, läßt sich der steile Abfall des Blutdrucks auf Null ganz kritisch feststellen, und zwar gilt der erste Abfall (y) in der verzeichneten Kurve. Die zwei später verzeichneten Wiederanstiege des Blutdrucks sind Einflüsse der gestörten Atmung. Der Tod des ganzen Tieres kann schon bei der ersten kritischen Senkung des Blutdrucks als ein definitiver angesehen werden. Der Herzschlag wird während der Infusion der Digitalislösung etwa bei deren Halbzeit (x) schon gestört. Die Amplituden werden größer.

Wir haben später darauf verzichtet, die Herztätigkeit unmittelbar zu verfolgen, sondern sie mittelbar durch die Beobachtung der Herzströme im Seitengalvanometer kontrolliert. Zur Verwendung kam das kleine, sehr handliche und billige Elektromagnet-Saitengalvanometer von Edelmann, München. Die Herzströme wurden durch Nadelelektroden unter Einschaltung eines Kondensators von 20 MF der Saite zugeleitet. Die Beobachtung der Saitentätigkeit erfolgte subjektiv unter Projektion auf eine Mattscheibe. Die ganze, sehr einfache Apparatur kann bei Tageslicht im Experimentierraum aufgestellt beobachtet werden. Wenn man die subjektive Beobachtung mit der objektiven Aufzeichnung der Kurve Abb. 1 vergleicht, so ist zu sagen, daß die Amplituden der Saite zunächst sehr klein sind, etwa $1-1^1/_2$ Teilstriche des Okularmikrometers, bei Punkt x der verzeichneten Kurve stark zunehmen, und im Moment des kritischen tödlichen Blutdruckabfalls (y) aufhören. Es können noch einige elektrische Pulse wie auch mechanische erfolgen, die wir aber ignoriert haben. Wir haben auch bei dem elektrischen

Phänomen die tödliche Wirkung beim ersten Blutdruckabfall notiert, nachdem uns besondere Versuche darüber aufgeklärt hatten, daß, wenn man im Moment des kritischen Blutdruckabfalls den Zufluß der Digitalislösung abstoppt, das Herz tot blieb.

Besondere Sorgfalt verwendeten wir auf die Art der Infusion. Wir haben keine Bürette, also keinen hydrostatischen Druck zur Infusion in die Vene verwendet, sondern die Präzisionsmotorspritze von Heuwing[2] bevorzugt, aus Gründen, die in der Veröffentlichung über diese Spritze angegeben sind.

Der eigentliche Zweck dieser Untersuchung war jedoch nicht die grundsätzliche Erprobung bzw. erreichte Verfeinerung der Knaffl-Lenz-Methode an sich. Es sollte vielmehr erreicht werden, daß die nach Knaffl-Lenz ermittelten Meerschweinchenwerte in zuverlässiger Weise in Froschwerte umgerechnet werden können, d. h. mit anderen Worten, die beanstandete Auswertung am Frosch im gegebenen Falle überhaupt entbehrlich zu machen. Solche Fälle würden gegeben sein in der schlechten Jahreszeit der Froschauswertung und würden wohl besonders der pharmazeutischen Industrie von Nutzen sein, die erfahrungsgemäß die Herstellung ihrer Spezialitäten nicht leicht an eine bestimmte kurze Frist des Jahres knüpfen kann. Da uns die Ermittlung der zugehörigen Froschwerte aus der Literatur nicht zuverlässig erschien, haben wir von einem und demselben Blattmaterial mit größter Genauigkeit sowohl den Froschtiter als auch den Meerschweinchentiter ermittelt.

Methode.

Die Narkose wurde mit einer 10%igen Äthylurethanlösung ausgeführt, die in gleichen Mengen beiderseits in die Glutäalmuskulatur injiziert wurde, und zwar 1,5 g Urethan pro kg Meerschweinchen. Genau 2 Stunden nach der Injektion wurde mit der Freilegung der Vena jugularis begonnen, und darauf geachtet, daß bei allen Versuchen die Operationsdauer ungefähr gleich war. 2 Stunden warteten wir einesteils deshalb, weil nach Ablauf dieser Zeit die Tiere meist ruhig und gleichmäßig schliefen. Zur Vermeidung von Fehlern ist darauf zu achten, daß bei allen zu den Versuchen verwendeten Tieren die Narkose in ein im allgemeinen gleiches Tiefestadium eingetreten ist, soweit eine Deutung aus dem Schlafe des Tieres in diesem Sinne überhaupt möglich ist. Andererseits hielten wir diese Zeitspanne von 2 Stunden für die Resorption des Narkoticums insofern günstig, als während dieser Zeit die größte Menge im Tierkörper bereits zur Wirkung gekommen ist. Es ist bekannt, daß die Ergebnisse bei der Auswertung von Digitalisglykosiden von der Art des Narkoticums abhängig sind. Aber auch das Stadium der Narkose, das von der resorbierten Menge des Mittels abhängig ist, scheint, wie uns schon aus früheren Versuchen bekannt ist,

[2] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 456 (1937).

in unserem Falle ein maßgeblicher Faktor für die Empfindlichkeit des Tierkörpers gegenüber Digitalisglykosiden zu sein.

Unsere Versuche erstreckten sich auf die Monate Januar bis September. Saisoneinflüsse haben wir an den Meerschweinchen weder während der kalten noch der heißen Jahreszeit bemerkt. Die Tiere waren im großen und ganzen gleichmäßig empfindlich. Wir hatten allerdings einmal einen starken Fehlschlag mit einer ganz frischen Sendung Meerschweinchen, die in offenbar verwahrlostem Zustande ankamen. Nachdem wir seit diesem Mißerfolg die Tiere vor der Benutzung bei gutem Futter erst mindestens 10 Tage im Tierstall pflegten, sind solche Unstimmigkeiten nicht mehr aufgetreten. Wenn ein Tier stark aus der Reihe herausfiel, ergab die Sektion fast immer einen Lungenbefund. Man wird infolgedessen gut tun, bei den Tieren immer die Lungensektion zu machen, und die Resultate der wirklich kranken Tiere auszuschalten. Auch fanden wir es zweckmäßig, die Temperatur der Tiere vor dem Versuch zu kontrollieren, und fiebernde (40°), dann meist lungenkranke, nicht zu verwenden.

Herstellung der Extrakte.

Die für die Auswertung am Meerschweinchen und am Frosch verwendeten Extrakte wurden auf folgende Weise hergestellt:

I. Heißextrakt.

Da die zu prüfenden Blätter gleichzeitig am Meerschweinchen und am Frosch ausgewertet werden mußten, die Titration am Frosch bisher über den in Deutschland allgemein verwendeten Heißextrakt üblich war, wurde der Heißextrakt auch am Meerschweinchen geprüft.

Der Heißextrakt wurde folgendermaßen hergestellt: 1 g Folia Digitalis purpurea wird in 25 ccm 96%igem Äthylalkohol 24 Stunden bei Zimmertemperatur maceriert (bei den höherwertigen Drogen wie Folia Digitalis lanata und Herba convallariae wird 1 g in 50 ccm Äthanol angesetzt). Alsdann wird eine halbe Stunde am Rückflußkühler am Sieden erhalten, heiß filtriert, das Filtrat im Vakuum unter 40° vom Alkohol befreit und bis auf einen feuchten Rest eingedampft. Dieser Rückstand wird für die Auswertung am Meerschweinchen in so viel 70%igem Alkohol gelöst, daß 1 g Droge in 10 bzw. 20 ccm enthalten ist. Das Chlorophyll ist in diesem Extrakt in echter Lösung enthalten.

Für die Froschauswertungen wird der noch feuchte Destillationsrückstand von Folia Digitalis purpurea in 5 ccm 96%igem Alkohol gelöst (bei Folia Digitalis lanata und Herba convallariae in 10 ccm Äthanol) und auf ein Volumen von 25 bzw. 50 ccm mit Wasser aufgefüllt. Dieser Extrakt muß so schnell wie möglich injiziert werden, da er wenig haltbar ist.

Um höchste Genauigkeit zu erzielen, wurden die Frösche im Thermostatenraum bei einer Temperatur von 18—20° gehalten. Ebenso wurde darauf geachtet, daß die Frösche der Versuchsreihen von annähernd gleichem Gewicht waren. Die Auswertungen erfolgten nach der üblichen zeitlosen Methode der amtlichen Deutschen Vorschrift, und die Berechnung der Resultate nach der Formel von Kärber[3].

[3] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **162**, 480 (1931).

II. Kaltextrakt.

Unter Kaltextrakt verstehen wir ein Macerat, das nach der Vorschrift von Berry und Davis[4] hergestellt wird: 5 g der zu untersuchenden Blätter werden mit 50 ccm 70%igem Äthylalkohol versetzt und bei Zimmertemperatur 48 Stunden lang unter gelegentlichem Umschütteln maceriert. Dieser Extrakt wird durch ein Glasfilter filtriert und ist analog dem oben erwähnten Heißextrakt für Meerschweinchen.

Für die Titration am Frosch wird dieser Extrakt so verdünnt, daß 1 g Folia Digitalis purpurea bzw. 0,5 g Folia Digitalis lanata oder 0,5 g Herba convallariae in 25 ccm 20%igem Alkohol enthalten ist.

Für die Auswertung am Meerschweinchen wurde zunächst sowohl der Kaltextrakt wie der Heißextrakt von Folia Digitalis purpurea mit 0,9%iger Kochsalzlösung so verdünnt, daß die Wirksamkeit von 1,25 g Blatt in 100 ccm zu infundierender Flüssigkeit enthalten war (K.). Diese Methode ergab für Folia Digitalis purpurea brauchbare Werte. Es war jedoch nicht möglich, sie auf andere Digitalisstoffe zu übertragen, da sich die Streuung innerhalb der einzelnen Reihen als so groß herausstellte, daß die Resultate unbrauchbar wurden.

Zunächst haben wir untersucht, ob etwa eine Steigerung der Konzentration der zu infundierenden Flüssigkeit an wirksamen Stoffen weiterführen würde und haben die Versuche mit 10%igen Drogenextrakten ausgeführt. Dazu sind aber einige Auseinandersetzungen über Methodisches vorauszuschicken.

Höhere Konzentration der wirksamen Stoffe der Droge verlangt aber auch eine höhere Konzentration des Lösungsmittels, des Alkohols. Die Infusion höher konzentrierten Alkohols scheint a priori möglich, wenn die alkoholische Lösung mit großer Langsamkeit infundiert wird. Diese Forderung kann durch die Präzisionsmotorspritze von Heuwing erfüllt werden, denn sie erlaubt es, fehlerlos mit einer Geschwindigkeit von 2 ccm pro Stunde zu infundieren. Nach der Toxizität der in der Lösung enthaltenen Glykoside für das Meerschweinchen ist die tödliche Dosis bei Verwendung eines 10%igen Drogenextrakts gut in 0,5–1 ccm unterzubringen.

Spezielle Versuche mit 70%igem Alkohol allein haben ergeben, daß dieser mit der angegebenen Geschwindigkeit ohne jedes Bedenken dem Tier infundiert werden kann. Infolgedessen wurden sämtliche Drogenextrakte in 70%igem Äthylalkohol unverdünnt infundiert. Es hat sich herausgestellt, daß je nach der Größe des Meerschweinchens das zu infundierende Quantum 0,4—0,7 ccm/Tier beträgt (Z.). Die Geschwindigkeit der Infusionen wurde stets so gehalten, daß 0,5 ccm des Extrakts innerhalb von 15 Minuten in die Vene einflossen. So wurden bei den Versuchen die Auswertungen in Zeiten, die zwischen 10 und 30 Minuten für die tödliche Menge lagen, durchgeführt.

[4] Quart. J. Pharmacol. **8**, 445 (1935).

Die Froschwerte wurden in Froschdosen, d. h. in g Frosch pro g Folia berechnet und ausgedrückt, und die Meerschweinchenwerte analog, d. h. die Anzahl der getöteten g Meerschweinchen auf 1 g Folia. Wenn man die beiden so erhaltenen Werte Froschtiter und Meerschweinchentiter zueinander in Beziehung setzt, so bekommt man durch Division Meerschweincheneinheit : Froschtiter eine Zahl, die der von uns gesuchte Umrechnungsfaktor ist. Verglichen wurde von jeder Droge ein Heißextrakt am Meerschweinchen mit einem Heißextrakt am Frosch, und ebenso die Kaltextrakte, soweit die entsprechenden Parallelversuche am Frosch vorhanden waren.

Resultate.

Folia Digitalis purpurea, Heißextrakt.

Wir haben nach diesem Gesichtspunkt eine Reihe von Folia Digitalis purpurea-Sorten untersucht. Die Resultate sind in der Tabelle 1a wiedergegeben. Im letzten Stabe der Tabellen ist der Koeffizient angegeben. Der Umrechnungskoeffizient ist immer größer als 1, das besagt, daß das Meerschweinchen bei intravenöser Infusion empfindlicher ist gegen ein und denselben Digitalisextrakt als der Frosch. Die Koeffizienten stimmen untereinander genügend überein, und betragen im Mittel 2,65.

Tabelle 1a. Heißextrakte.

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in cmm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge	Tödliche Dosis FD./g Droge	Koeffizient ME./FD.
			Folia Digitalis purpurea Nr. 1.				
17	550	10 %iger Extrakt	280	1,96	5090	2150	2,37
21	600		340	1,76	5667		2,64
15	500		275	1,81	5500		2,56
21	600		360	1,66	6000		2,79
24	650		390	1,66	6000		2,79
			Mittelwert:	1,77	5651	2150	2,63
			Folia Digitalis purpurea Nr. 2.				
15	500	10 %iger Extrakt	280	1,78	5600	2000	2,80
15	500		300	1,67	6000		3,00
17	550		320	1,72	5818		2,91
15	500		310	1,61	6200		3,10
15	500		310	1,61	6200		3,10
13	450		265	1,69	5889		2,94
			Mittelwert:	1,68	5951	2000	2,98
			Folia Digitalis purpurea Merck.				
15	500	10 %iger Extrakt	300	1,66	6000	2100	2,86
15	500		310	1,61	6200		2,95
15	500		300	1,66	6000		2,86
13	450		285	1,61	6333		3,02
15	500		300	1,66	6000		2,86
			Mittelwert:	1,64	6107	2100	2,91

Tabelle 1a. Heißextrakte (Fortsetzung).

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge ccm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in ccm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge	Tödliche Dosis FD./g Droge	Koeffizient ME./FD.
			Folia Digitalis purpurea Deutscher Standard 1939.				
24	700	10 %iger Extrakt	445	1,57	6357	2750	2,31
24	700		485	1,42	6929		2,52
24	700		480	1,46	6857		2,49
20	650		450	1,44	6923		2,51
15	500		350	1,43	7000		2,54
31	1000		670	1,49	6700		2,44
			Mittelwert:	1,47	6794	2750	2,47
			Folia Digitalis purpurea Nr. 10.				
12	550	10 %iger Extrakt	280	—	5091	2000	2,55
13	475		260	—	5473		2,76
13	500		285	—	5700		2,85
13	525		320	—	6095		3,05
14	525		305	—	5619		2,81
12	462		250	—	5456		2,73
12	450		240	—	5333		2,67
14	525		295	—	5618		2,81
11	425		255	—	5511		2,78
12	425		230	—	5412		2,71
14	525		285	—	5428		2,71
			Mittelwert:	—	5522	2000	2,76
			Folia Digitalis purpurea Internationaler Standard 1936.				
13	450	10 %iger Extrakt	350	1,28	7778	3825	2,04
15	500		450	1,10	9000		2,35
15	500		420	1,19	8400		2,20
12	400		300	1,33	7500		1,96
12	400		315	1,30	7875		2,06
12	400		360	1,11	9000		2,35
			Mittelwert:	1,22	8259	3825	2,16

Folia Digitalis purpurea.

Tabelle 1b. Kaltextrakte.

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in cmm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge	Tödliche Dosis FD./g Droge	Koeffizient ME./FD.
			Folia Digitalis purpurea Merck.				
25	850	10 %iger Extrakt	625	1,36	7353	2770	2,65
25	900		625	1,44	6944		2,51
23	800		560	1,43	7000		2,53
26	850		620	1,37	7294		2,63
20	650		450	1,44	6923		2,49
20	650		440	1,47	6769		2,44
23	750		490	1,53	6533		2,36
23	750		525	1,43	7000		2,53
21	700		440	1,59	6286		2,27
21	700		460	1,52	6571		2,37
18	600		400	1,50	6667		2,37
			Mittelwert:	1,46	6849	2770	2,47

Tabelle 1b. Kaltextrakte (Fortsetzung).

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge ccm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in ccm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge	Tödliche Dosis FD./g Droge	Koeffizient ME./FD.
Folia Digitalis purpurea Deutscher Standard 1939.							
15	500	10 %iger Extrakt	400	1,25	8000	3650	2,19
15	500		400	1,25	8000		2,19
15	500		430	1,16	8600		2,36
14	450		355	1,26	7889		2,16
14	450		400	1,13	8889		2,44
			Mittelwert:	1,21	8276	3650	2,27
Folia Digitalis purpurea Internationaler Standard 1936.							
13	450	10 %iger Extrakt	290	1,55	6444	3700	1,74
13	450		270	1,67	6000		1,62
11	400		250	1,60	6250		1,69
16	500		280	1,79	5600		1,51
13	450		270	1,66	6000		1,62
16	500		340	1,47	6800		1,84
			Mittelwert:	1,63	6182	3700	1,67

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in cmm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge
Folia Digitalis purpurea Nr. 1.					
12	400	10 %iger Extrakt	360	1,11	9 000
12	400		330	1,21	8 250
17	550		450	1,22	8 182
25	800		680	1,18	8 500
12	400		360	1,11	9 000
			Mittelwert:	1,17	8 586
Folia Digitalis purpurea Nr. 2.					
12	400	10 %iger Extrakt	350	0,88	8 750
10	350		310	0,89	8 857
14	450		425	0,97	9 444
14	450		450	1,00	10 000
12	400		340	0,85	8 500
			Mittelwert:	0,92	9 110
Folia Digitalis purpurea Nr. 3.					
14	450	10 %iger Extrakt	280	1,61	6 222
10	350		250	1,40	7 143
10	350		250	1,40	7 143
10	350		240	1,46	6 857
21	700		565	1,24	8 071
			Mittelwert:	1,42	7 087

Die Ermittlung des Umrechnungsfaktors für Kaltextrakte schien deshalb wünschenswert, weil nach unseren Erfahrungen die Werte bei der Kaltextraktion durchwegs höher liegen als bei der Heißextraktion. Die Tabelle 1c gibt darüber Aufschluß.

Tabelle 1c. Folia Digitalis purpurea.

	Heißextrakt ME.	Wirkungssteigerung	Kaltextrakt ME.	Heißextrakt FD.	Wirkungssteigerung	Kaltextrakt FD.
Folia Nr. 1	5651	52 %	8586			
„ Nr. 2	5951	53 %	9110			
„ Merck	6107	12 %	6849	2100	32 %	2770
Folia Deutscher Standard 1939	6794	22 %	8276	2750	33 %	3650
		Wirkungsabnahme				
Folia Internationaler Standard 1936 . .	8259	25 %	6182	3825	—	3700

Es entzieht sich unserer Kenntnis, wie diese hohen Werte bei der Kaltextraktion zustande kommen. Der Koeffizient für Folia Digitalis purpurea bei der Kaltextraktion ist 2,37.

Bemerkenswert ist, daß der Koeffizient für den Internationalen Standard 1936 aus der Reihe fällt. Er ist auch schon beim Heißextrakt merklich niedriger, d. h. die Blätter sind am Frosch relativ stärker wirksam wie am Meerschweinchen. Die Froschwerte sind dagegen sowohl beim Heißextrakt wie beim Kaltextrakt von annähernd der gleichen Größe (3825 und 3700 FD./g).

Folia Digitalis lanata.

Untersucht wurden sechs Sorten von Folia Digitalis lanata. Diese Droge hat bekanntlich einen sehr hohen Froschwert. Es zeigte sich, daß der Meerschweinchenwert ihm konform erhöht ist. Der Koeffizient ist bei der Heißextraktion 2,04. Er ist der Größenordnung nach nicht weit entfernt von dem der Digitalis purpurea.

Tabelle 2a. Heißextrakte.

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in cmm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge	Tödliche Dosis FD./g Droge	Koeffizient ME./FD.
Folia Digitalis lanata Nr. 1.							
15	450	5 %iger Extrakt	310	1,45	13 778	7000	1,97
12	350		250	1,40	14 286		2,04
12	350		260	1,34	14 858		2,12
12	350		260	1,34	14 858		2,12
15	450		320	1,41	14 222		2,03
18	550		390	1,41	14 182		2,03
			Mittelwert:	1,39	14 364	7000	2,05

Tabelle 2a. Heißextrakte (Fortsetzung).

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in ccm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME/g Droge	Tödliche Dosis FD./g Droge	Koeffizient ME./FD.
			Folia Digitalis lanata Nr. 2.				
18	600	5%iger Extrakt	390	1,54	13 000	6000	2,17
18	600		400	1,50	13 334		2,22
13	425		260	1.63	12 236		2,04
21	700		450	1,56	12 858		2,14
12	400		250	1,60	12 500		2,08
10	350		220	1,59	12 572		2,10
			Mittelwert:	1,57	12 750	6000	2,13
			Folia Digitalis lanata Nr. 3.				
21	700	5%iger Extrakt	300	2,33	8 572	5600	1,53
19	650		300	2,17	9 230		1,65
15	500		250	2,00	10 000		1,79
24	800		330	2,42	8 250		1,47
13	450		225	2,00	10 000		1,79
14	500		250	2,00	10 000		1,79
			Mittelwert:	2,15	9 342	5600	1,67
			Folia Digitalis lanata Nr. 4.				
14	500	5%iger Extrakt	340	—	13 600	6350	2,14
15	575		400	—	13 937		2,19
14	500		360	—	14 400		2,27
12	425		335	—	15 802		2,49
14	525		375	—	14 259		2,24
16	600		420	—	14 000		2,20
14	525		263	—	14 644		2,31
			Mittelwert:	—	14 378	6350	2,26
			Folia Digitalis lanata Nr. 5.				
7	275	10%iger Extrakt	315	—	11 454	6000	1,91
10	350		370	—	10 571		1,76
10	350		410	—	11 714		1,95
7	275		305	—	11 091		1,85
7	270		300	—	11 111		1,85
9	300		330	—	11 000		1,83
7	250		290	—	11 600		1,93
			Mittelwert:	—	11 220	6000	1,88
			Folia Digitalis lanata Nr. 6.				
7	300	5%iger Extrakt	255	—	17 000	6800	2,50
8	325		240	—	14 769		2,17
9	300		240	—	16 000		2,35
7	250		190	—	15 200		2,23
7	250		200	—	16 000		2,35
7	250		215	—	17 200		2,50
9	350		240	—	13 720		2,00
			Mittelwert:	—	15 699	6800	2,30

Tabelle 2b. Kaltextrakte.

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in cmm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge
		Folia Digitalis lanata Nr. 1.			
15	450	5 %iger Extrakt	300	1,50	13 333
12	400		250	1,60	12 500
12	400		240	1,66	12 000
13	400		245	1,63	12 250
11	350		240	1,46	13 714
				Mittelwert: 1,57	12 760
		Folia Digitalis lanata Nr. 2.			
15	500	5 %iger Extrakt	340	1,47	13 600
13	400		260	1,54	13 000
15	450		275	2,00	12 222
12	400		240	1,66	12 000
16	500		350	1,43	14 000
10	350		260	1,35	14 857
				Mittelwert: 1,58	13 280
		Folia Digitalis lanata Nr. 3.			
13	400	5 %iger Extrakt	240	1,67	12 000
11	350		210	1,67	12 000
11	350		240	1,46	13 714
13	400		256	1,56	12 800
10	350		240	1,46	13 714
9	300		210	1,43	14 000
				Mittelwert: 1,54	13 038

Die Wirksamkeit des Kaltextrakts von Folia Digitalis lanata wurde nur am Meerschweinchen geprüft, und auf die Ermittlung des Koeffizienten verzichtet.

Die Meerschweinchenwerte dagegen wurden festgestellt. Der Vergleich von Heißextrakt und Kaltextrakt am Meerschweinchen ist in der Tabelle 2c wiedergegeben.

Tabelle 2c. Folia Digitalis lanata.

	Heißextrakt ME.	Kaltextrakt ME.	
Nr. 1.....	14 364	12 760	Wirkungsabnahme: 11 %
Nr. 2.....	12 750	13 280	Wirkungszunahme: 4,2 %
Nr. 3.....	9 342	13 038	„ : 40 %

Herba convalleriae.

Tabelle 3a. Heißextrakte.

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in cmm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge	Tödliche Dosis FD./g Droge	Koeffizient ME./FD.
			Herba Nr. 1.				
14	450	5 %iger Extrakt	340	1,32	15 111	10 300	1,47
13	350		300	1,17	17 143		1,65
14	400		365	1,10	18 250		1,77
10	300		260	1,15	17 333		1,69
10	300		240	1,25	16 000		1,55
12	350		260	1,34	14 857		1,44
			Mittelwert:	1,22	16 449	10 300	1,60
			Herba Nr. 2.				
8	250	10 %iger Extrakt	180	1,37	7 200	4 800	1,50
26	800		640	1,25	8 000		1,67
28	850		650	1,30	7 647		1,59
31	1000		830	1,21	8 300		1,75
			Mittelwert:	1,28	7 787	4 800	1,63

Herba convallariae ist bekanntlich sehr hochwertig am Frosch und unter sich sehr verschiedenwertig. Für das Meerschweinchen fanden wir den Froschwerten gleichsinnige Werte, und im ganzen einen niedrigeren Koeffizienten, nämlich 1,73. Es hat sich also gezeigt, daß der Koeffizient jeweils ein Individualwert der Droge ist. Während Folia Digitalis purpurea und lanata nahestehende Koeffizienten haben, weicht der von convallaria beträchtlich ab.

Tabelle 3b. Kaltextrakte.

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm		Gewicht des Tieres g	Extraktmenge in cmm / Gewicht des Tieres in g	Tödliche Dosis ME./g Droge
			Herba Nr. 1.		
14	400	5 %iger Extrakt	375	1,07	18 750
14	400		385	1,04	19 250
14	400		320	1,25	16 000
14	400		325	1,22	16 250
16	450		450	1,00	20 000
14	400		375	1,07	18 750
			Mittelwert:	1,11	18 167
			Herba Nr. 2.		
32	1050	5 %iger Extrakt	320	3,28	6 095
30	1000		300	3,33	6 000
31	1000		290	3,45	5 800
32	1000		290	3,45	5 800
27	900		310	2,90	6 888
46	1500		450	3,33	6 000
			Mittelwert:	3,29	6 097

Der Kaltextrakt von Herba convallariae ist in seiner Meerschweinchenwirksamkeit nicht wesentlich verschieden vom Heißextrakt.

k-Strophantin.

Tabelle 4. (Verdünnung 1 : 3333). Froschtiter: 0,00000047 g/gFrosch.

Infusionsdauer Min.	Extraktmenge cmm	Gewicht des Tieres g	Tödliche Dosis ME./Droge	Tödliche Dosis FD./g Droge	Koeffizient ME./FD.
23	750	360	1,441 Mill.	2,13 Mill.	0,68
19	600	285	1,426 „		0,67
15	500	240	1,441 „		0,68
11	350	200	1,716 „		0,81
13	400	210	1,576 „		0,74
17	600	270	1,351 „		0,63
15	500	220	1,321 „		0,62
14	400	215	1,614 „		0,76
		Mittelwert:	1,486 Mill.	2,13 Mill.	0,70

Es hat sich gezeigt, daß das Meerschweinchen gegen k-Strophanthin eine größere Resistenz aufweist als der Frosch. Dementsprechend ergab sich ein Koeffizient von 0,7, also kleiner als 1. Auch der k-Strophanthinkoeffizient erweist sich als ein Individualwert.

Noch einmal tabellarisch zusammengefaßt sind die Umrechnungskoeffizienten der untersuchten einzelnen Drogen von Meerschweincheneinheit auf Froschtiter folgende:

	Heißextraktion	Kaltextraktion
Folia Digitalis purpurea.....	2,65	2,37
Folia Digitalis lanata	2,04	
Herba Convallariae	1,73	
k-Strophanthin	—	0,70

Anhang.

Fehlergrenzenberechnung (Zinnitz).

Nachdem in der vorliegenden Untersuchung die technischen Methoden soweit wie möglich verbessert und verfeinert wurden, schien es noch wünschenswert, die Fehlergrenze rechnerisch zu erfassen.

Bei der Bestimmung der Fehlergrenzen unserer Versuche bedienten wir uns der Methode der kleinsten Quadrate von Gauß. Um hier gleichzeitig alle Beziehungen, die sich aus den Zahlen der Einzelergebnisse ableiten lassen, insgesamt zu erfassen, berechneten wir für alle Einzelversuche das Verhältnis aus der tödlich wirkenden Extraktmenge in cmm zum Gewicht des vergifteten Tieres. Für jede Versuchsserie bei einer Extraktauswertung wurde ein Mittelwert berechnet. Die Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert wurden nach den bekannten Formeln von Gauß bestimmt. Für die Auswertungsergebnisse jedes Extrakts wurden jeweils der mittlere Fehler des Mittelwertes, der wahrscheinliche Fehler

des Mittelwertes, der mittlere Fehler einer Bestimmung und der wahrscheinliche Fehler einer Bestimmung festgestellt. Der mittlere Fehler des Mittelwertes läßt sich nach der Formel $E = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n\,(n-1)}}$, und der wahrscheinliche Fehler des Mittelwertes aus dem Produkt $E_w = 0{,}674 \,.\, E$ berechnen, der mittlere Fehler einer Einzelbestimmung nach der Formel $e = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$, und der wahrscheinliche Fehler einer Einzelbestimmung aus dem Produkt $e_w = 0{,}674 \,.\, e$. Dabei ist d der Fehler, Σ die Summe der Fehlerquadrate, n die Zahl der Bestimmungen, E der Wert des Fehlers (Mittelwert), e der Wert des Fehlers (Einzelwert), E_w der wahrscheinliche Fehler (Mittelwert), e_w der wahrscheinliche Fehler (Einzelwert). Die Fehlergrenzen wurden für alle Versuchsreihen in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5.

	M	mM	wM	mE	wE	Extraktkonzentration
Folia Digitalis purpurea. Heißextrakte.						
Deutscher Standard	1,47	0,013	0,008	0,056	0,038	10 %ig
Folia Merck	1,64	0,013	0,008	0,027	0,019	10 %ig
Folia 1	1,77	0,059	0,038	0,132	0,089	10 %ig
Folia 2	1,68	0,027	0,018	0,066	0,045	10 %ig
Internationaler Standard	1,22	0,040	0,027	0,010	0,067	10 %ig
Kaltextrakte.						
Deutscher Standard	1,21	0,027	0,018	0,060	0,041	10 %ig
Folia Merck	1,46	0,021	0,014	0,068	0,046	10 %ig
Folia 1	1,17	0,023	0,015	0,051	0,034	10 %ig
Folia 2	0,92	0,029	0,019	0,063	0,043	10 %ig
Folia 3	1,42	0,066	0,044	0,204	0,137	10 %ig
Internationaler Standard	1,63	0,044	0,030	0,108	0,073	10 %ig
Folia Digitalis lanata. Heißextrakte.						
Folia 1	1,39	0,018	0,012	0,044	0,029	5 %ig
Folia 2	1,57	0,019	0,013	0,047	0,031	5 %ig
Folia 3	2,15	0,076	0,051	0,186	0,125	5 %ig
Kaltextrakte.						
Folia 1	1,57	0,039	0,026	0,086	0,058	5 %ig
Folia 2	1,58	0,096	0,065	0,235	0,158	5 %ig
Folia 3	1,54	0,044	0,030	0,109	0,073	5 %ig
Herba convallariae. Heißextrakte.						
Herba 1	1,22	0,040	0,027	0,097	0,066	5 %ig
Herba 2	1,28	0,026	0,017	0,052	0,035	10 %ig
Kaltextrakte.						
Herba 1	1,11	0,133	0,090	0,103	0,069	5 %ig
Herba 2	3,29	0,263	0,177	0,203	0,137	5 %ig

M = Mittelwert, mM = ± mittlerer Fehler des Mittelwertes, wM = ± wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes, mE = ± mittlerer Fehler der Einzelbestimmung, wE = ± wahrscheinlicher Fehler einer Einzelbestimmung.

Zusammenfassung.

1. Es werden Koeffizienten ermittelt, mit Hilfe deren man den gefundenen Meerschweinchentiter von Digitalisstoffen in gesuchten Froschtiter umrechnen kann.

2. Dadurch können die jahreszeitlichen Schwierigkeiten bei der Froschauswertung umgangen werden.

3. Die Methode von Knaffl-Lenz der intravenösen Infusion am Meerschweinchen wird modifiziert.

4. Die Koeffizienten sind für die einzelnen Digitalisdrogen individuell.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Über das sogenannte Sulfhämoglobin.

Von

Fritz Jung*.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Oktober 1939.)

I. Einleitung.

Ein krankhaftes Geschehen läßt sich in vielen Fällen mit Hilfe des Blutfarbstoffs beurteilen. Können wir doch Reaktionen, die sich an ihm abspielen, am Wechsel seiner Farbe besonders gut verfolgen. So hat man auch bei der Vergiftung mit Schwefelwasserstoff schon früh nach Veränderungen am Blute gesucht. Beobachtungen über Hydrothionämie gehen ziemlich weit zurück. Die ersten eingehenden Untersuchungen stammen von Hoppe-Seyler (1). Dieser beschreibt 1863 eine grüne Verfärbung des Blutfarbstoffs nach Einwirken von Schwefelwasserstoff. Da sie nur bei Gegenwart von Sauerstoff statthat, schreibt er sie einem Abbau des Hämoglobins zu, an dem H_2S wie O_2 zusammenwirken. Andere Autoren (2) konnten diesen Befund bestätigen. In einer späteren Mitteilung weist Hoppe-Seyler (3) noch auf einen Lichtabsorptionsstreifen im roten Teil des Spektrums hin, der auf H_2S-Behandlung auftritt. Um Methämoglobin oder Hämatin könne es sich dabei nicht handeln, da diese Stoffe an einer anderen Stelle absorbieren und andere chemische Reaktionen zeigen. Es mag bedauerlich sein, daß in der Folgezeit diese einfachen und eindeutigen Befunde nicht genügend beachtet wurden; mancher Irrtum wäre vermieden worden. Einen ähnlichen Absorptionsstreifen findet 1888 De Ruyter (4) im Blute schwer septisch Erkrankter. Schließlich beschreibt 1898 Erich Meyer (5) in einer ausführlichen Arbeit die Schwefelwasserstoffvergiftung. Den sogenannten „Sulfhämoglobinstreifen" findet er aber nur bei Einatmung sehr großer Mengen Schwefelwasserstoff und bei tödlichem Ausgang der Vergiftung. Bei einem langsamen Verlauf vermag er nichts zu bemerken. Der Begriff Sulfhämoglobin ist zu einer Zeit entstanden, als man auf dem neuen Gebiet der Blutchemie immer wieder andere und überraschende Phänomene des Farbwechsels beobachten konnte und diese dann Umwandlungsprodukten des Hämoglobins zuschrieb. Die meisten dieser Hämoglobine mußten später bei einer eingehenden Untersuchung wieder verschwinden. Das Sulfhämoglobin hat seinen umstrittenen Platz bis in die

* D 11.

jüngste Zeit behauptet. Sein Auftreten bei der Vergiftung mit H_2S, sowie nach dem Tode infolge von Darmfäulnis als Pseudomelanin, endlich die einfache Art der Darstellung in vitro mögen dazu beigetragen haben.

Die Abgrenzung des Sulfhämoglobins gegen andere ähnliche Farbstoffe wurde von Wood Clarke und Hurtley (6) mit Hilfe der Verschiebung seiner Absorptionsbande im Roten bei Zugabe von CO. von Hijmans van den Bergh und Wieringa (7) durch sein Nichtreagieren mit Cyanid vollzogen. Die so häufige Verwechslung mit Methämoglobin konnte damit vermieden werden. Immerhin wurde die Reaktion nicht so bekannt, daß nicht trotzdem noch einige Verwirrung entstehen konnte. In jüngerer Zeit beschreiben Evelyn und Malloy (8) ein Bestimmungsverfahren im Blute. Dieses setzt allerdings voraus, daß außer Methämoglobin — keine anderen Farbstoffe im Blute vorhanden sind.

Vergiftungen mit anderen Blutgiften, wie Kohlenoxyd oder Methämoglobinbildnern, führen meist zu einfachen oder gar berechenbaren Verhältnissen zwischen aufgenommener Giftmenge und umgewandeltem Blutfarbstoff. Beim Schwefelwasserstoff konnte man zunächst in keiner Weise eindeutige Beziehungen finden. Ebensowenig, wie es in vitro gelingen wollte, ein reines Sulfhämoglobin darzustellen, konnte man sein Auftreten bei Vergiftungen in ein Schema fassen. Hijmans van den Bergh (9) fand dasselbe bei länger dauernden Stuhlverstopfungen, vor allem bei Frauen, im Blute, wo es sich zum Teil sehr lange halten konnte. Meyer (5) dagegen bemerkte bei länger anhaltender, nicht zu großer Schwefelwasserstoffzufuhr keine Spur im Blute. Versuche in vitro sollten darüber eine Aufklärung bringen: man dachte nämlich, es könnte zur Bildung des Sulfhämoglobins eine Art „Sensibilisierung" des Blutes nötig sein. Beobachtungen von Clarke und Hurtley (6) waren im Sinne eines solchen Phänomens gedeutet worden. Bei Zusatz einer geringen Menge Phenylhydrazin war die Bildung von Sulfhämoglobin in einer mit Schwefelwasserstoff behandelten Blutprobe viel intensiver und rascher. Unter denselben Bedingungen hatte H_2S allein kaum eine Veränderung des Blutes gebracht und Phenylhydrazin allein nur reduziert. Weitere Untersuchungen von Hijmans van den Bergh und Engelkes (9) knüpften an diesem Punkt an. In vitro ergab sich eine Steigerung der Sulfhämoglobinbildung nach Zusatz von Phenylhydrazin, Hydrazin, Diphenylamin, p-Phenylendiamin, Isatin und Anilin. Keinen deutlichen Effekt gaben dagegen Resorcin, Nitrobenzol, Cystein und Harnstoff. Später fanden Ivens und van Vollenhoven (10), daß auch p-Aminophenol sehr stark „sensibilisierend" wirkt. Man dachte sich erst, das wesentliche an diesen Stoffen sei ihre Reduktionswirkung. Da aber H_2S mit reduziertem Blut nicht reagiert, mußte dieser Gedanke wieder fallen. Wegen der Notwendigkeit von Sauerstoff bei der Reaktion überlegte sich auch Hijmans van den Bergh (9), ob nicht bei der Sulfhämoglobinbildung eine Aktivierung desselben stattfinde. Er kam damit unseren heutigen Anschauungen sehr

nahe. Kennen wir doch alle „sensibilisierenden", besser aktivierenden Stoffe als ausgesprochene Methämoglobinbildner, d. h. gegenüber dem Blutfarbstoff als oxydationsfördernde Substanzen.

Die Beobachtungen von Snapper (11) ergänzten diese Versuche in vitro sinnvoll. Nach einer chronischen Zufuhr von Phenazetin fand er bei vielen Patienten eine ausgesprochene Cyanose. Er stellte ausdrücklich fest, daß diese nicht von Methämoglobin, sondern von Sulfhämoglobin herrührte. Bei den Patienten war im allgemeinen eine erschwerte Darmpassage nicht festzustellen, auch sonst ließ sich keine Ursache für eine Schwefelwasserstoffvergiftung aufzeigen. Dafür trat das Phänomen bei einer gleichzeitigen Erkrankung der Leber viel leichter hervor. Nach Beobachtungen von Roessingh (12) kann sich unter Umständen das Sulfhämoglobin in den unversehrten Blutkörperchen wochenlang halten. [Nach Snapper (11) lassen sich diese Erfahrungen in England besonders häufig machen, entsprechend der Beliebtheit des Phenazetins.] Auch in der jüngsten Zeit wird über ähnliche Vorgänge nach der Gabe von Sulfonamiden berichtet. Beobachtungen von Laves (13) und von Barkan (14) könnten ebenfalls hier angeführt werden, doch ist es um der Kürze willen unterlassen.

Bei der Bildung von Sulfhämoglobin können wir nach diesen Erfahrungen vielleicht jetzt schon zwei Faktoren in ihrem Zusammenspiel sehen. Wenigstens weisen uns die widersprechenden Befunde von Hijmans van den Bergh (9) und Snapper (11) darauf hin, daß die ursprünglichen Überlegungen zur Sulfhämoglobinentstehung das Problem doch nicht ganz erfassen.

II. Die Reaktionsmöglichkeiten zwischen dem Blutfarbstoff und dem Schwefelwasserstoff.

Zunächst will ich einen Überblick darüber geben, welches die Reaktionsmöglichkeiten zwischen Schwefelwasserstoff und Blutfarbstoff sind. Ich gehe dabei von Beobachtungen früherer Autoren aus, die ich durch eigene Versuche ergänzt habe.

In den folgenden Versuchen wurden hämolysierte Rinderblutkörperchen verwandt, die zuvor mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen worden waren. Der Sauerstoff wurde durch längeres Durchleiten von Wasserstoff entfernt. Das Reaktionsgemisch konnte aus dem Reaktionsgefäß ohne Berührung mit Luft direkt in die Küvette des Spektrographen gebracht werden. Der Schwefelwasserstoff wurde im Kippapparat aus Eisensulfid und Salzsäure entwickelt und vor dem Einleiten ins Reaktionsgefäß mit Wasser gewaschen. Der Verlauf der Lichtabsorption wurde zunächst mit einem Handspektroskop beobachtet, er konnte in dem Spektrodensographen von Zeiß-Ikon objektiv festgehalten werden. Die abgebildeten Kurven sind mit diesem Instrument gewonnen.

1. Reines sauerstoffreies Hämoglobin reagiert nicht mit Schwefelwasserstoff. Beim Zusammenbringen erhält man keine Änderung der Lichtabsorption. Dieser Befund [Hoppe-Seyler (1)] läßt sich jederzeit leicht bestätigen.

2. Methämoglobin reagiert mit Schwefelwasserstoff unter Bildung einer charakteristischen Anlagerungsverbindung: Sulfmethämoglobin (besser: Thiomethämoglobin). Das dreiwertige Eisen des Methämoglobins tritt also mit dem H_2S in einer ähnlichen Art und Weise zusammen wie mit Cyanid, Fluorid und auch Rhodanid (15). Keilin (16) sowie Drabkin und Austin (17) haben die Lichtabsorption dieser Verbindung untersucht. Wie eigene Versuche zeigten, ist diese im Gegensatz zu anderen Methämoglobinverbindungen nicht sehr konstant. Schwefelwasserstoff als ein sehr starkes

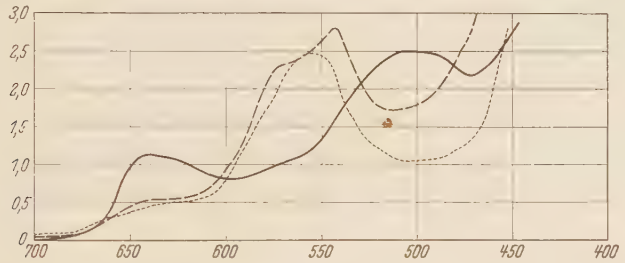


Abb. 1. Bildung von Thiomethämoglobin. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Lichtabsorption in willkürlichen Einheiten.
Ausgezogen: Methämoglobin vor dem Versuch.
Gestrichelt: Sofort nach Zugabe von Schwefelwasserstoff.
Punktiert: Lichtabsorption 6 Stunden später.

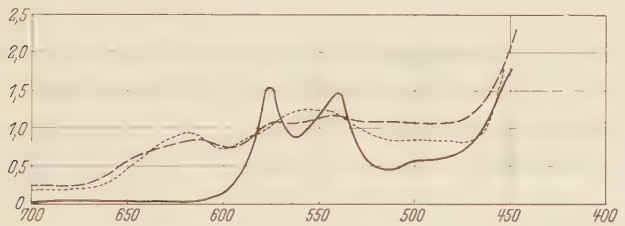


Abb. 2. Bildung von Sulfhämoglobin.
Ausgezogen: Oxyhämoglobin vor dem Versuch.
Gestrichelt: Nach Einleiten von Schwefelwasserstoff und Luft.
Punktiert: Nach Reduktion mit Natriumhydrosulfit.
Aus dem Verlauf der Kurve ist ersichtlich, daß am Ende des Versuchs noch Hämoglobin vorhanden war.

Reduktionsmittel führt im Verlauf einiger Stunden das Eisen des Methämoglobins in die Ferroform über. Dieser Vorgang läßt sich an der Änderung der Farbe sehr gut verfolgen. Gleichzeitig trübt sich die Lösung etwas durch ausgeschiedenen Schwefel. Sauerstoffabschluß während des ganzen Versuchs ist unbedingt notwendig. Das Ergebnis eines unter dieser Vorsichtsmaßregel durchgeführten Versuchs zeigt Abb. 1.

3. Einen ganz anderen Vorgang kann man dagegen beobachten, wenn man Schwefelwasserstoff und Oxyhämoglobin zusammenbringt. Die Lösung wird allmählich, während des Einleitens von H_2S, dunkler und grünbraun. Dasselbe ließ sich auch erreichen, wenn eine mit H_2S gesättigte Hämoglobinlösung mit Luft geschüttelt wurde. Es tritt sofort eine Licht-

absorption im Roten auf, die dann wieder ein wenig abblaßt. Eine vollkommene Umwandlung konnte ich entsprechend den Literaturangaben nie erzielen. Den Verlauf der Lichtabsorption des reinen Sulfhämoglobins kennt man nur aus Berechnungen, die von Drabkin und Austin (17) durchgeführt wurden. Doch haftet solchen immer ein großes Maß von Ungenauigkeit an. Das Ergebnis eines Versuchs zeigt Abb. 2.

4. Hier sei noch eine weitere Beobachtung erwähnt, die möglicherweise auch in diesen Fragenkreis gehört. Bei der Reduktion von Methämoglobin mit Ammonsulfid tritt nicht, wie auf Hydrosulfit, sofort das Spektrum des reduzierten Hämoglobins auf, sondern dazwischen läßt sich noch ein „Oxyhämoglobin"-Spektrum beobachten. Dieses verschwindet allmählich wieder, gleichzeitig trübt sich die Lösung etwas durch ausfallenden Schwefel. Dann erst zeigt sich die Hämoglobinbande.

III. Sulfhämoglobin und Verdohämochromogen.

Untersuchungen von Barkan (18) brachten völlig neue Gesichtspunkte zu unserer Fragestellung. Bei seinen Arbeiten (19, 20) über Abbauprodukte

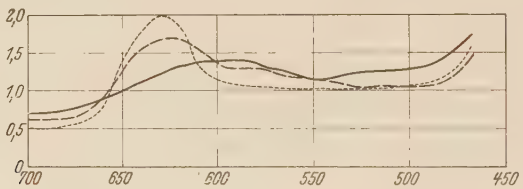


Abb. 3. Pseudohämoglobin nach Barkan (Verdohämochromogen).
Ausgezogen: Nach Einwirken von H_2O_2 und KCN auf Blut.
Gestrichelt: Dasselbe nach Reduktion mit Natriumhydrosulfit.
Punktiert: Nach Einleiten von Kohlenoxyd.

des Blutes von grüner Farbe, zog er auch das Sulfhämoglobin in den Kreis seiner Betrachtungen. Das ähnliche chemische Verhalten, wie die gleichartige Lichtabsorption läßt seine Ansicht begründet erscheinen, daß auch das „Sulfhämoglobin" zu diesen Abbauprodukten des Blutfarbstoffs zu zählen ist. Eingehende Untersuchungen von Lemberg und Mitarbeitern (21, 22) haben die Struktur dieser grünen Verbindungen — „Verdohämochromogene" nach diesem Autor — aufgeklärt. Sie haben die Eigenschaft, einen Teil ihres Eisens bereits mit verdünnter Salzsäure abzugeben (19); sie reagieren in charakteristischer Weise mit Kohlenoxyd und lassen sich mit Hilfe ihrer Lichtabsorption gut beurteilen. Alle diese Eigenschaften kennen wir vom Sulfhämoglobin her [Barkan (18)]. Am einfachsten lassen sich solche Verdohämochromogene nach dem Vorgang von Barkan (der sie Pseudohämoglobin nennt), durch Behandlung von Blut mit Wasserstoffsuperoxyd und Kaliumcyanid gewinnen.

Hämolysierte Blutkörperchen, die in Phosphatpuffer $p_H = 7$ eingebracht sind, werden mit einigen Tropfen 5%iger Kaliumcyanidlösung versetzt. Dann wird H_2O_2 zugegeben, bis die Mischung von grüner Farbe erscheint. Durch Dialyse läßt sich überschüssiges KCN und H_2O_2 entfernen. Abb. 3 zeigt die Lichtabsorption vor und nach Reduktion, sowie nach Einleiten von Kohlenoxyd.

Schales (23) stellte nun fest, daß sich bei der Reaktion von Schwefelwasserstoff mit Sauerstoff in wässeriger Lösung Wasserstoffsuperoxyd nachweisen läßt. Damit wurde eine Brücke von der gewöhnlichen Herstellungsweise des „Sulfhämoglobins" zu der des „Pseudohämoglobins" nach Barkan, also einem Verdohämochromogen geschlagen.

Die physiologische Bedeutung dieser Verdohämochromogene besteht darin, daß sie als Abbaustufe des Hämoglobins bei der Bildung der Gallenfarbstoffe (22) eine Rolle spielen. Auch bei anderen Abbaureaktionen des Hämoglobins treten sie auf. So ist der grüne Farbstoff des Streptococcus viridans ebenso in diese Gruppe zu nehmen wie die grünen Produkte, die nach Bebrütung mit Pneumokokken in einer Blutagarplatte entstehen (24).

In den letzten Jahren wurde auch sonst von den verschiedensten Seiten beobachtet, daß bei der Einwirkung von zugleich reduzierenden wie oxydierenden Stoffen auf Blut Grünfärbungen auftraten (25). Eine Bildung in vivo hat wohl als erster Lewin (26) beobachtet. Er konnte bei Hähnen, denen er Phenylhydrazin auf die Haut getropft hatte, einen grünen Farbstoff aus dem Blut isolieren. Er nannte ihn Hämoverdin. Die Befunde von Edlbacher (27), der bei der Einwirkung von Ascorbinsäure auf Blut, in Gegenwart von Sauerstoff, eine Vergrünung fand, möchte ich schon deswegen erwähnen, weil dabei keine körperfremden Stoffe mitwirkten. Schließlich sind die Werte von Barkan (20) über das leicht abspaltbare Bluteisen, die ich bestätigen konnte, auch in einer solchen Richtung zu deuten. Sie machen es wahrscheinlich, daß beim Gesunden ständig solche Stoffe in geringer Menge im Blute vorkommen.

Für die verschiedenartige Entstehungsweise der Verdohämochromogene ist es bisher noch nicht restlos geglückt, einen einheitlichen Gesichtspunkt zu finden. Einen kleinen Beitrag dazu sollen die folgenden Versuche liefern. Ich komme mit ihnen auf den Umstand zurück, daß eine große Anzahl von Methämoglobinbildnern die Entstehung von Sulfhämoglobin „sensibilisieren" soll.

IV. Bildung von Verdohämochromogenen durch Methämoglobinbildner.

Der Vorgang von Barkan (19), mit Hilfe von H_2O_2 grüne Blutfarbstoffderivate zu gewinnen, schien mir nur der Sonderfall einer allgemeineren Regel zu sein. Wasserstoffsuperoxyd ist an und für sich ein Methämoglobinbildner. Doch wird beim Zusammenbringen mit Blut die Katalase so rasch wirksam, daß es zu keinem sichtbaren Effekt auf den Farbstoff kommt. Die folgenden Versuche wurden deshalb unter möglichster Ausschaltung dieses Ferments vorgenommen.

Rinder- oder Menschenblutkörperchen wurden mehrere Male mit Kochsalzlösung gewaschen und dann hämolysiert. Das Hämolysat wurde daraufhin wiederholt mit Aluminiumoxyd geschüttelt; sein Zentrifugat zeigte nur noch eine geringe

Wirkung auf Wasserstoffsuperoxyd. Um die Wasserstoffionenkonzentration eindeutig festzulegen, wurde diese Lösung zu gleichen Teilen mit n/10 Phosphat- bzw. Boratpuffer nach Sörensen versetzt. Sämtliche hier berichteten Versuche sind in gepufferten Lösungen durchgeführt worden. Die Lichtabsorption wurde zuerst mit einem Handspektroskop beurteilt; sollte sie festgehalten werden, so erfolgte eine Aufnahme mit dem Spektrodensographen.

1. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

Da mit dem p_H auch die Art eines oxydativen Angriffs sich ändern kann, wurde dieses zunächst bei der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd variiert. Nach Reduktion des Reaktionsgemisches ließ sich schon bei neutraler Reaktion deutlich eine schwache Absorptionsbande im Roten sehen. Zunächst befand sich ein Streifen etwa bei 620 mμ, der aber allmählich verschwindend einem solchen bei 640 mμ Platz machte. Wurde die Reaktion von $p_H = 7$ auf $p_H = 9$ geändert, so erschien die Absorption im

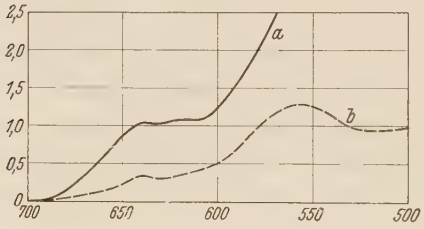


Abb. 4. Bildung von Verdohämochromogen bei alkalischer Reaktion. Spektrophotogramm nach Reduktion mit Natriumhydrosulfit.

a) Ausgezogen: Nach Einwirken von H_2O_2 bei $p_H = 9$ auf Hämoglobin. Da die Hämoglobinkonzentration ziemlich groß war und sehr viel Hämoglobin unverändert geblieben ist, kommt die Absorption im Grünen nicht mehr auf die Kurve.

b) Gestrichelt: Nach Einwirken von p-Aminophenol bei $p_H = 11$. Die Kurve ist bei einer wesentlich stärkeren Verdünnung aufgenommen wie oben.

Roten schon viel kräftiger. Sie ist in Abb. 4a spektrophotometrisch dargestellt. (Auf dieser Kurve sind nebeneinander die beiden Maxima bei 620 und 640 mμ zu erkennen: zur Zeit der Ausmessung war die oben erwähnte Umwandlung noch im Gang.) Noch eindrucksvoller erschien der Effekt, wenn die Reaktion der Lösung das $p_H = 11$ besaß (vgl. Abb. 4b). Die Bande im Roten war bei direkter Beobachtung nie zu sehen, sie trat erst auf Reduktion mit Hydrosulfit auf. Wie aus der kräftigen Absorption im grünen Teil des Spektrums hervorgeht, ist nur ein kleiner Teil des Hämoglobins umgewandelt worden. Daher sah auch die Lösung nicht grün, sondern braun aus.

Gleichzeitig mit Cyanid versetzte Kontrollen ergaben sofort nach H_2O_2-Zugabe eine kräftige Grünfärbung. Sie zeigten keine Spur von Hämoglobin mehr. Das Ergebnis wie die Versuchsanordnung siehe Abb. 3 (S. 20).

Bei der Vergiftung mit aromatischen Methämoglobinbildnern ist die Rolle des Wasserstoffsuperoxyds als Zwischenprodukt der Reaktion mit dem Blut noch völlig unklar. Auf dieselbe Weise wie oben wurde deshalb die Einwirkung von p-Aminophenol auf Blut untersucht: Bei neutraler Reaktion ließ sich nach dem Einwirken auf Hämoglobin neben Methämo-

globin keine Spur von Verdohämochromogen nachweisen. Bei einem $p_H = 9$ dagegen war die Rotbande schon deutlich zu sehen. Den Befund bei einem $p_H = 11$ habe ich in Abb. 4b festgehalten. In beiden Fällen war die Beurteilung durch die Bildung brauner, wohl indophenolartiger Abkömmlinge des p-Aminophenols etwas beeinträchtigt.

Auf den Verbindungstyp eines Verdohämochromogens weist auch der Befund von Riedel (28), der nach Einwirken von Pyridin auf Blut zunächst Methämoglobin, nach Reduktion jedoch eine Absorptionsbande im kurzwelligen Rot beobachten konnte (Pyridin ist sowohl stark alkalisch wie Fermentgift).

Schließlich möchte ich an dieser Stelle noch das Kaliumchlorat erwähnen. Unter den zahlreichen Abbauprodukten, die nach seinem Einwirken auf Blut entstehen, läßt sich ein Verdohämochromogen eindeutig nachweisen. Die Identifizierung der Bande konnte durch die Reaktion mit CO noch gesichert werden.

2. Einwirkung in Gegenwart von Kaliumcyanid.

Bei der Darstellung von Pseudohämoglobin setzt Barkan (19) Cyanid zu, wohl um die Katalase auszuschalten. Es lag nicht allzu ferne, dies auch bei der Einwirkung von Methämoglobinbildnern zu versuchen. Wegen der Vergiftung der Katalase war es in den folgenden Versuchen nicht nötig, die Blutlösung besonders vorzubereiten. Doch wurden die Versuche stets in gepufferten Lösungen vorgenommen, um eine Reaktionsverschiebung durch das stark alkalische Cyanid zu vermeiden.

Das Ergebnis war durchaus überraschend. Die Gifte, die erst eine kräftige Methämoglobinbildung gezeigt hatten, erzeugten nun entsprechend Verdohämochromogen. Verwandt wurden p-Aminophenol, Phenylhydroxylamin und p-Chinon. Das erhaltene Produkt ließ sich in allen Fällen eindeutig durch Reduktion, Lichtabsorption und Reaktion mit CO charakterisieren. Eine Täuschung durch Methämoglobin, das daneben noch mehr oder weniger gebildet wurde, ist schon wegen der Anwesenheit des Cyanids ausgeschlossen. Dieses bringt ja die Methämoglobinbande zum Verschwinden. Die Ergebnisse für p-Aminophenol und Chinon sind in Abb. 5 und 6 festgehalten. Eine Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration ins Alkalische ergab eine noch stärkere Wirkung.

Dasselbe wurde auch mit Kaliumchlorat versucht. In Anwesenheit von Cyanid trat nicht einmal merkliche Methämoglobinbildung auf. Die mit Kaliumchlorat gesättigte Hämoglobinlösung zeigte noch nach mehreren Tagen ein eindeutiges Oxyhämoglobinspektrum. Im Laufe der Zeit trat nur eine Trübung auf. Man könnte daher annehmen, daß vielleicht ein Teil der Wirkung des Chlorats, nämlich auf das Bluteiweiß, erhalten geblieben ist. Die Reaktion von Chlorat mit dem Blut ist von Nickel (29) und Rudolf Mayer (30) untersucht worden. Nach letzterem wird die

Reduktion des Chlorats durch die katalytische Wirkung des Blutfarbstoffs in Gang gebracht. Dabei wird dieser selbst oxydiert. Da, den seitherigen Befunden nach, Cyanid mit Hämoglobin nicht reagiert, muß die Katalyse wohl durch einen Stoff verursacht sein, der uns noch unbekannt ist. Die Hemmung durch Cyanid läßt vermuten, daß eine Verbindung mit dreiwertigem Eisen im Spiele ist. Wenigstens ist für dem Blutfarbstoff ähnlich gebaute Substanzen bekannt, daß diejenigen mit dreiwertigem Eisen leicht, die mit zweiwertigem Eisen dagegen nicht mit Cyanid reagieren *.

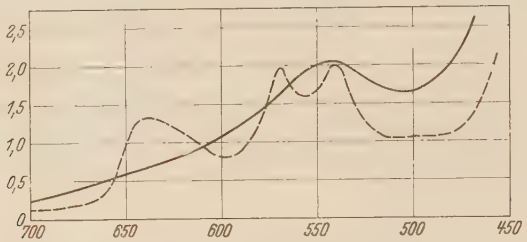


Abb. 5. Bildung von Verdohämochromogen mit p-Aminophenol in Gegenwart von HCN bei neutraler Reaktion.
Ausgezogen: Unmittelbar nach dem Versuch, im wesentlichen ist die Lichtabsorptionskurve des Cyanmethämoglobins zu sehen.
Gestrichelt: Nach Reduktion und CO-Zugabe. Neben CO-Hämoglobin starke Absorption im Roten.

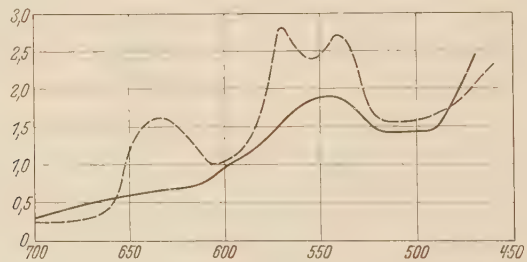


Abb. 6. Bildung von Verdohämochromogen mit Chinon in Gegenwart von HCN. Bezeichnung und Behandlung wie Abb. 5.

Die Methämoglobinbildung durch Nitrit schien in keiner Weise beeinflußt zu werden. Sie ist entsprechend den chemischen Eigenschaften des Nitrits bezüglich ihrer Geschwindigkeit sehr vom p_H abhängig. Aber auch nach Cyanidzugabe konnte ich keine Bildung von Verdohämochromogenen bemerken. [Rolf Meier (37) berichtet zwar über eine Grünfärbung nach Nitriteinwirkung, doch nur bei sehr stark saurer Reaktion, die an und für sich den Blutfarbstoff angreift.] Dasselbe gilt auch für die Einwirkung von Ferricyankalium auf Blut.

* Ammon und Dirscherl: Fermente, Vitamine und Hormone. 1938, S. 79.

3. Versuche zur Katalasehemmung.

Die Aufgabe des Cyanids bei den hier geschilderten Versuchen ist zunächst völlig dunkel. Wir kennen von ihm als bemerkenswerteste Eigenschaft, daß es die Katalase hemmt. Doch kommt Barkan (19) auf Grund verschiedener Überlegungen zu der Überzeugung, daß dies nicht die wesentliche Wirkung sein kann. Möglicherweise spielt bei dem ganzen Reaktionsablauf seine Fähigkeit eine Rolle, mit dreiwertigem Eisen feste Komplexe zu bilden. Zu der Bedeutung der Katalase bei unserer Reaktion läßt sich noch eine eigentümliche Beobachtung anführen.

Ein beliebter Vorlesungsversuch zur Frage der Fermenthemmung ist die Einwirkung von Cyanid auf Blutkatalase. Die Wirkung derselben scheint auch tatsächlich völlig verschwunden. Unter der Reaktion wird das Blut zunehmend grün gefärbt. Dann aber muß aus didaktischen Gründen das Objekt aus dem Gesichtskreis der Hörer entfernt werden. Nachträglich setzt nämlich ganz plötzlich und intensiv eine neue Entwicklung von Sauerstoff und Schaum ein.

Dazu lassen sich verschiedene Möglichkeiten denken:

1. Das H_2O_2 zerstört das Cyanid.

2. Da die entstehende, dreiwertiges Eisen enthaltende Verbindung auch Cyanid bindet, entzieht sie dieses der Katalase. Diese wird dann allmählich wieder wirksam.

3. Die entstandene grüne Verbindung mit ihrem dreiwertigen Eisen kann auch eine Katalasewirkung entfalten.

Das Problem der Katalasehemmung kann also nicht so einfach sein, wie es sich zunächst darstellt.

Ebenso wie das Cyanid können auch Rhodanwasserstoff, Stickstoffwasserstoffsäure und schließlich auch Schwefelwasserstoff mit dreiwertigem Eisen Komplexe bilden. Sie sind uns auch als Fermentgifte bekannt. Schließlich wissen wir auch vom Schwefelwasserstoff und Rhodanwasserstoff (nach eigenen unveröffentlichten Versuchen), daß sie sich mit Methämoglobin zusammenlagern können. Deshalb führte ich mit diesen Verbindungen dieselben Versuche aus, wie mit dem Cyanid. Ich ließ Wasserstoffsuperoxyd, p-Aminophenol und p-Chinon in ihrer Gegenwart auf Blut einwirken. Rhodanid und Azid wurden der Blutprobe direkt zugesetzt, Schwefelwasserstoff ganz kurz eingeleitet. Kontrollen mit Chinon oder p-Aminophenol allein zeigten Bildung von Methämoglobin, mit Wasserstoffsuperoxyd allein nur Gasentwicklung.

In allen drei Proben (HN_3, HCNS und H_2S) konnte bei dem Zusammenwirken mit Wasserstoffsuperoxyd eine rasche Verfärbung und eine nur sehr geringe Katalasewirkung festgestellt werden. Die spektroskopische Untersuchung wie die Reaktion mit CO ergab in jedem Falle eindeutig die Anwesenheit von Verdohämochromogen. Dasselbe ergaben auch die Versuche mit p-Aminophenol und p-Chinon statt Wasserstoffsuperoxyd. Doch stand hier die Methämoglobinbildung mehr im Vordergrund. Verdohämochromogene fehlten aber niemals.

Eine spezifische Wirkung des Cyanids läßt sich damit ausschließen. Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um eine Hemmung der Katalase dreht, wird bedeutend größer. Überlegungen von Bingold (31) weisen darauf hin, daß die Blutkatalase den Blutfarbstoff vor Wasserstoffsuperoxyd zu schützen hat, das im Stoffwechsel entsteht. Wird dieses Ferment in seiner Wirkung ausgeschaltet oder beeinträchtigt, so vermag das H_2O_2 das Hämoglobin anzugreifen und je nach den Umständen zu Methämoglobin umzuwandeln, Verdohämochromogene zu bilden oder gar zu farblosen Produkten abzubauen. Es fragt sich nun, wieweit solches auch für die Blutwirkung von Chinon und ähnlichen Stoffen gesagt werden kann. Für einen fermentativen Vorgang dabei würde folgende Beobachtung sprechen: Eine mit Cyanid versetzte Blutlösung verfärbt sich auf Chinonzugabe fast augenblicklich, während in der cyanidfreien Lösung die Methämoglobinbildung viel allmählicher eintritt. Ob allerdings das in diesem Fall gehemmte Ferment eine Katalase ist, läßt sich kaum sagen. Man könnte auch an Peroxydasen und andere Oxydationsfermente denken. Immerhin glaube ich, daß eine eingehendere Untersuchung der Kinetik dieser Reaktion vielleicht lohnend wäre.

V. Sulfhämoglobin.

Unter den Verbindungen, die die Katalase hemmen, haben wir auch den Schwefelwasserstoff getroffen. Wir haben ihn als Komplexbildner mit Methämoglobin kennengelernt und wissen, daß er in dieser Beziehung mit Cyanid und Rhodanid in eine Reihe gestellt werden kann. Besonders aber haben wir bemerkt, daß bei seiner Oxydation freies Peroxyd auftreten kann. Aus diesen Beobachtungen heraus aber können wir zu einer bestimmten Auffassung über die Bildung von Sulfhämoglobin gelangen. Die Beobachtungen von Hijmans van den Bergh (9) wie Snapper (11) werden eine verhältnismäßig einfache Lösung finden.

Wirkt Schwefelwasserstoff auf Blut ein, so dürfte er sich zunächst, wie wir es von seinem Verhalten gegenüber Methämoglobin ableiten können, mit dreiwertigen Eisenverbindungen im Blute zusammenlagern. Damit aber würde er die Fermentsysteme ausschalten, die den Blutfarbstoff vor einem oxydativen Abbau zu schützen haben. Tritt nun Sauerstoff hinzu, so entsteht bei der Oxydation aktiver Sauerstoff. Diesem aber würde der nun ungeschützte Blutfarbstoff anheimfallen, damit würde es zur Bildung von Verdohämochromogenen oder „Sulfhämoglobin“ kommen. Dabei braucht aber die Eiweißkomponente des Hämoglobins kaum angegriffen zu werden. Die entstandene Verbindung verhält sich kolloidchemisch ja fast wie das Hämoglobin. Barkan würde dann mit seiner Bezeichnung „Pseudohämoglobin“ weitgehend recht behalten.

Wirkt nun aber auf ein Blut, in dem die Fermentsysteme durch H_2S-Einwirkung vergiftet sind, ein Methämoglobinbildner ein, so wird dieser

neben Methämoglobin — je nach seinem Reaktionsmechanismus — auch Verdohämochromogene erzeugen. Das Methämoglobin kann der Organismus wieder gut reduzieren, es braucht gar nicht in Erscheinung zu treten. Das „Sulfhämoglobin" häuft sich in den Zellen an. So sehen wir es insonderheit bei wiederholten Gaben, wobei der Zeitfaktor wichtig wird. Der Kranke erscheint uns zyanotisch, sein Blut ist dunkel, ohne daß wir mit den üblichen Bestimmungsmethoden des Hämoglobins und seiner bekanntesten Derivate die Ursache finden können.

Damit aber kommen wir auch auf die Beobachtungen von Hijmans van den Bergh (9) und Snapper (11). Was sie für eine „Sensibilisierung" des Blutfarbstoffs zur Bildung von Sulfhämoglobin gehalten haben, ist in Wirklichkeit eine erhöhte Anfälligkeit gegen einen oxydativen Angriff. Diese wird durch Hemmung schützender Fermente durch den Schwefelwasserstoff verursacht. Dagegen ist der Stoff, der den Blutfarbstoff im Laufe seiner Reaktion tatsächlich angreift, Wasserstoffperoxyd oder andere oxydierende Verbindungen, deren Bildung durch das Phenazetin oder Phenylhydrazin begünstigt oder ermöglicht wird. Der Schwefelwasserstoff als Noxe ist soweit sehr interessant, als er beide Wirkungen in sich vereinigt; daraus aber kann man manche der entstandenen Unklarheiten ableiten.

(An dieser Stelle möchte ich nicht versäumen, auf das ganz ähnliche Verhalten des Arsenwasserstoffs hinzuweisen. Von ihm ist ebenfalls bekannt, daß er den Blutfarbstoff zu grünen Derivaten abbauen kann [Meissner (32, 33)]. Er vermag bei seiner Verbrennung den Sauerstoff zu aktivieren, und es ist wahrscheinlich, daß er auch Fermente vergiften kann.)

Die aufgestellte Frage wäre aber damit noch nicht restlos befriedigend geklärt. Eingehende Untersuchungen des in vitro erzeugten Sulfhämoglobins zeigen unter Umständen gewisse Unterschiede gegenüber anderen Verdohämochromogenen. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen behauptet eine Arbeit von Michel (34), es enthalte eine seinem Eisengehalt äquivalente Menge Schwefel. Außerdem soll der Schwefelwasserstoff, allerdings nur im nicht erreichten Grenzfall, im molaren Verhältnis 1/1 mit dem Hämoglobin reagieren. Daraus folgert er, daß die ursprüngliche Anschauung, das Sulfhämoglobin sei eine Anlagerungsverbindung des Hämoglobins, zu Recht besteht. Man könnte aber auch daran denken, daß überschüssiger Schwefelwasserstoff sich mit dem nach der Oxydation dreiwertigen Eisen zusammenlagert und eine Anlagerungsverbindung bildet, wie wir sie vom Methämoglobin kennen. Nach Untersuchungen von Barkan (19) findet dieser Vorgang auch tatsächlich mit Cyanid statt. So wird, auch wenn die Befunde von Michel sich bestätigen lassen, die Tatsache kaum angegriffen, daß das Sulfhämoglobin zu den Verdohämochromogenen gehört. Die verschiedenen Möglichkeiten, über die Michel zu einer Sulfhämoglobinentstehung kommt, lassen sich zwanglos auf meine oben geschilderte Anschauung zurückführen.

Michel wie Haurowitz (35) weisen ferner darauf hin, daß aus Sulfhämoglobin durch alkalische Hydrolyse noch Hämochromogen gewonnen werden könne. Aber bei allen Methoden der Sulfhämoglobindarstellung läßt sich eine gleichzeitige Hämatin oder Häminentstehung nicht vermeiden. Meist ist sogar noch eine Spur

Hämoglobin vorhanden. Da das Hämochromogenspektrum außerordentlich in die Augen springt, können noch sehr geringe Mengen zu einer Täuschung führen [Barkan (18)].

VI. Physiologische Bedeutung.

1. Bei der Einwirkung von vielen methämoglobinbildenden Stoffen auf Blut entstehen also unter Umständen neben dem Methämoglobin auch Abbauprodukte des Blutfarbstoffs, die wir zu den Verdohämochromogenen rechnen. Das Methämoglobin vermag der Organismus, wenn es in den Blutkörperchen erhalten geblieben ist, wieder vollständig seiner normalen Funktion zuzuführen. Die Verdohämochromogene dagegen vermag er nicht mehr unmittelbar in Hämoglobin zurückzuverwandeln. Sie sind für den Körper Abfallprodukt und müssen ausgeschieden werden. Eine reine Methämoglobinbildung wäre an sich noch keine irreversible Schädigung des Körperbestandes, hier aber findet eine solche statt. Wir können aus dieser heraus die häufigen Erscheinungen eines verstärkten Blutabbaus nach der entsprechenden Vergiftung erklären — insonderheit wird das bei wiederholter Zufuhr des Giftes stattfinden.

2. Nach den Untersuchungen von Lemberg und Mitarbeitern (22), wie auch Barkan (18) erfolgt der weitere Abbau des Verdohämochromogens in Richtung Bilirubin. Für die Bilirubinentstehung und Ausscheidung ist in stärkstem Maße die Leber verantwortlich. Bei irgendwelchen Funktionsstörungen derselben kann der weitere Abbau des Verdohämochromogens in Frage gestellt werden. Dieses läßt sich dann viel leichter und länger im Blute beobachten. Wie schon erwähnt, konnte das Snapper (11) an seinen klinischen Fällen auch tatsächlich feststellen. Schon Hijmans van den Bergh (9) hat deshalb den weiteren Abbau des Sulfhämoglobins in der Leber angenommen. Wir sehen ihn heute ganz klar vor uns, im allgemeinen als normalen Stoffwechselvorgang, bei Leberstörungen oder gesteigerter Bildung von Sulfhämoglobin ins Pathologische gesteigert und verzerrt.

3. Wir haben oben gesehen, daß nicht alle methämoglobinbildenden Gifte in vitro Sulfhämoglobin erzeugen konnten. So ließ sich mit Nitrit kein Erfolg erzielen. Wir werden deshalb wieder die Parallele zum Vorgang am lebenden Organismus suchen. Bei normaler Funktion des Abbaues von Verdohämochromogen tritt das entstehende Bilirubin bei einer schweren Vergiftung vermehrt im Blute auf. Am Kranken werden wir dementsprechend einen Ikterus bemerken können. Als Folge einer bloßen Methämoglobinbildung bei einer Anilin-, Nitrobenzol-, Phenylhydroxylamin- oder Kaliumchloratvergiftung werden wir einen solchen wohl kaum erhalten; vielmehr werden wir bei seinem Auftreten an eine Bildung von Verdohämochromogen durch diese Stoffe denken. Bei einer Nitritvergiftung dagegen, bei der in vitro kein Verdohämochromogen entstanden ist, werden auch in vivo der Ikterus und andere Zeichen eines erhöhten Blutabbaus fehlen.

Soweit ich die Literatur überblicken konnte, wird auch in keinem Fall einer derartigen Vergiftung ein solches Phänomen erwähnt; bei einer Kaliumchloratvergiftung folgt er dagegen meist, ebenso bei Nitrobenzol usw. Man könnte wegen dieses besonderen und harmloseren Verhaltens das Nitrit von der Gruppe der anderen methämoglobinbildenden Gifte abtrennen.

4. Das „Sulfhämoglobin" ist als Abbauprodukt des Blutfarbstoffs in seinem kolloidchemischen Verhalten nicht so stabil wie das Hämoglobin selbst [Michel (34)]. Die Verdohämochromogene zeigen eine erhebliche Neigung aus der Lösung auszufallen. Die Verbindungen Edlbachers (27) und Lewins (26) waren bereits wasserunlöslich. Dabei erinnern wir uns, daß bei Vergiftung mit vielen Methämoglobinbildnern in den Blutkörperchen stark färbbare Körnchen gefunden werden. Diese Heinz-Ehrlichschen Körperchen hat man lange Zeit als Abbauprodukt des Blutfarbstoffs vermutet. Sie experimentell als identisch mit dem Verdohämochromogen nachzuweisen, ist wohl technisch nicht sehr einfach. Bezeichnenderweise hat man sie aber noch nie bei einer Nitritvergiftung gesehen. Daraus könnte man vielleicht den Schluß auf ihre Identität mit Verdohämochromogenen ziehen.

5. Verdohämochromogen ist nach Lemberg (22) ein normales Stoffwechselprodukt des Hämoglobins. Mit Hilfe des leicht abspaltbaren Eisens ist es nach Barkan (18) gut zu erfassen. Im allgemeinen kann es jedoch im Blute nicht gesehen werden. Über Beziehungen zum Porphyrinstoffwechsel sind erst wenig Erfahrungen bekannt [vgl. Rimington (36)]. Dasselbe gilt auch für die Bildung einer Sulfhämoglobinämie nach Sulfonamidgaben und ähnlichen Arzneimitteln.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine kurze Übersicht über die Bedingungen der Entstehung einer „Sulfhämoglobinämie" gegeben.

2. Die Reaktionsmöglichkeiten des H_2S mit dem Blutfarbstoff werden dargelegt.

3. Versuche über Bildung grüner Farbstoffe aus Hämoglobin durch methämoglobinbildende Gifte werden beschrieben.

4. Die Wirkung des Cyanids bei der Bildung dieser Farbstoffe wird der des Rhodanids, Azids und Sulfids gegenübergestellt. Aus diesen Versuchen folgt eine einheitliche Auffassung der Entstehungsbedingungen von „Sulfhämoglobin" und Verdohämochromogenen.

5. Einige Beobachtungen bei „Sulfhämoglobinämie", wie bei Vergiftung mit Methämoglobinbildnern werden auf Grund der angestellten Versuche gedeutet.

Literatur.

1) Hoppe-Seyler, F.: Zbl. med. Wiss. **1**, 433 (1863). — 2) Kaufmann, S., u. J. Rosenthal: Ebenda **4**, 181 (1866). — 3) Hoppe-Seyler, F.: Ebenda **4**, 436 (1866). — 4) De Ruyter: Ther. Mh. **1888**, S. 393. — 5) Meyer, Erich: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **41**, 325 (1898). — 6) Clarke, Wood u. Hurtley: J. Physiol. (Brit.) **36**, 62 (1907); zitiert nach Hijmans v. d. Bergh: Klin. Wschr. **1922**, S. 1932. — 7) Hijmans van den Bergh u. Wieringa: J. Physiol. (Brit.) **51**, 407 (1924). — Evelyn u. Malloy: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — 9) Hijmans van den Bergh u. Engelkes: Klin. Wschr. **1922**, S. 1932. — 10) Ivens u. van Vollenhoven: Ndld. Tschr. Geneesk. **69**, 447 (1925); zitiert nach Michel: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 323 (1938). — 11) Snapper: Dtsch. med. Wschr. **1925**, S. 648. — 12) Roessingh: zitiert nach Hijmans v. d. Bergh u. Engelkes: Klin. Wschr. **1922**, S. 1932. — 13) Laves: Nach Reuter-Lieb-Weyrich: Gifte und Vergiftungen in der gerichtlichen Medizin, S. 1130. Berlin-Wien 1938. — 14) Barkan u. Schales: Z. physiol. Chem. **248**, 96 (1937). — 15) Eigene unveröff. Versuche. — 16) Keilin: Proc. roy. Soc., Lond., Ser. B: Biol. Sci. **113**, 393 (1933). — 17) Drabkin u. Austin: J. biol. Chem. (Am.) **112**, 51 (1935). — 18) Barkan u. Schales: Z. physiol. Chem. **254**, 241 (1938). — 19) Barkan u. Schales: Ebenda **253**, 83 (1938). — 20) Barkan u. Schales: Ebenda **248**, 96 (1937). — 21) Lemberg: Biochem. J. **29**, 1322 (1935). — 22) Lemberg, Legge u. Lockwood: Ebenda **33**, 754 (1939). — 23) Schales: Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 447 (1938). — 24) Hart u. Anderson: J. Path. a. Bacter. **37**, 91 (1933); **39**, 465 (1934). — 25) Warburg u. Negelein: Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 1816 (1930). — 26) Lewin, zitiert nach L. Lewin: Gifte und Vergiftungen, S. 564. Berlin 1929. — 27) Edlbacher u. Segesser: Naturwiss. **1937**, S. 461, 557, 667. — 28) Riedel: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 39 (1939). — 29) Nickel: Inauguraldiss. Göttingen, 13. XI. 1920. — 30) Mayer, Rudolf: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **95**, 351 (1922). — 31) Bingold: Klin. Wschr. **1938**, S. 289. — 32) Meissner: Zeitschr. f. exper. Path. u. Therapie **13**, 284 (1913). — 33) Jung, F.: Biochem. Z. **302**, 294 (1939). — 34) Michel: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 323 (1938). — 35) Haurowitz: Z. physiol. Chem. **151**, 130 (1930). — 36) Rimington u. Hemmings: Biochem. J. **33**, 960 (1939). — 37) Meier, Rolf: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **110**, 241 (1925).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Sofia.
(Direktor: Prof. Dr. D. P. Orahovats.)

Die Bedeutung der Blutgefäße und des Herzens für die Regulierung des Blutdruckes.

Erste Mitteilung.

Von

T. Gotsev.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. August 1939.)

In der letzten Zeit sammelt man neuere und neuere Angaben bezüglich der Art und Weise, in welcher die Blutgefäße im Organismus auf einige längst bekannte Stoffe reagieren. Viele der früheren Auffassungen vom Einfluß einiger Pharmaca auf den Zustand der Blutgefäße haben Veränderungen erlitten, andere wurden ergänzt und erweitert. Allgemein nahm man an, daß Adrenalin Vasokonstriktion der Bauchorgane und der Extremitäten hervorriefe, und die Erhöhung des Blutdrucks erklärte man sich teils durch die in den Blutgefäßen eintretenden Veränderungen, teils durch die Wirkung des Adrenalins auf das Herz. Orahovats und Gotsev[1] stellten fest, daß die intravenöse Einspritzung von Adrenalin in den meisten Fällen Vasodilatation des Dünndarms und der Extremitäten und nur in einem Drittel der Fälle Vasokonstriktion hervorruft. Sturm und Dauter[2] machten die Feststellung, daß das Injizieren von Azetylcholin beim Menschen Konstriktion der Blutgefäße, und nicht Dilatation, wie man früher annahm, verursacht. Dasselbe wurde von uns[3] an den Blutgefäßen der Bauchorgane bei den Tieren beobachtet. Die allgemein verbreitete Ansicht, daß das Histamin Vasodilatation der Muskulatur, der Bauchorgane u. a. hervorrufe, wird in letzter Zeit angefochten. Klisiecki und Holobut[4] stellten durch häufig kontrollierte Versuche fest, daß das Histamin weder bei den Innenorganen, noch bei den Muskeln Vasodilatation verursacht. Die Verfasser finden ein regelmäßiges Zusammenziehen der Blutgefäße, und in keinem einzigen Falle wurde Vasodilatation beobachtet.

Die hier auftauchende Frage ist, welche Beziehung überhaupt zwischen den Veränderungen in dem funktionellen Zustand der Blutgefäße einerseits und den Veränderungen in dem Niveau des Blutdruckes andererseits besteht. Es ist bekannt, daß das Niveau des Blutdrucks u. a. auch von dem Durchschnitt der Blutgefäße abhängt. Es wird angenommen, daß das Zusammenziehen der Gefäße großer Gefäßgebiete, wie es die von Splanchnicus, die Muskulatur usw. darstellen, Erhöhung des Blutdruckes nach sich zieht. Umgekehrt führt Erweiterung der Blutgefäße zu Senkung des Blutdrucks.

Eine Ausnahme haben wir in demjenigen Falle, wo in einem anderen großen Gefäßgebiet die sogenannte „Balancierung" des Blutes eintritt.

Die Veränderungen, die in dem Niveau des Blutdrucks nach Einverleibung einer ganzen Reihe von Stoffen, wie Azetylcholin, Histamin, Veritol, Vasopressin, Ergotamin, Nikotin u. a., eintreten, sind noch immer hauptsächlich durch die Veränderungen zu erklären, die diese Stoffe bei den Blutgefäßen der verschiedenen Gefäßgebiete verursachen. Für die meisten von ihnen wird als sicher angenommen, daß sie einen peripheren Effekt haben, d. h. daß ihre Hauptwirkung sich auf den Zustand der Blutgefäße erstreckt.

Die Ergebnisse jedoch, die in der letzten Zeit von einigen Forschern bezüglich der Wirkung der erwähnten Pharmaca auf die Blutgefäße der verschiedenen Gefäßgebiete erzielt wurden, zeigen, daß die Veränderungen im Niveau des Blutdrucks durchaus nicht immer in ursächliche Abhängigkeit von den in den Blutgefäßen eintretenden Veränderungen gestellt werden können. In vielen Fällen tritt gleichzeitig mit der Erniedrigung des Blutdruckes Vasokonstriktion auf, wie dies bei der Einspritzung von Azetylcholin und Histamin beobachtet wurde. In anderen Fällen ist die Erhöhung des Blutdrucks von Dilatation der Blutgefäße begleitet, wie es in den meisten Fällen von Injizierung des Adrenalins beobachtet wird. Daraus geht hervor, daß in diesen Fällen die bisherige Erklärung für den Grund der Veränderung im Niveau des Blutdrucks falsch ist. Orahovats und Gotsev[1] haben mehrfach beobachtet, daß die Anwendung von ein und derselben Dosis Adrenalin immer dieselbe Erhöhung des Blutdrucks hervorruft, unabhängig davon, ob die Blutgefäße des Dünndarms und diejenigen der Extremitäten sich zusammenziehen oder erweitern. Bei einer Reihe von Versuchen haben wir[3] Erniedrigung des Blutdrucks nach Einspritzung von Azetylcholin beobachtet, unabhängig davon, daß in allen Fällen ohne Ausnahme Vasokonstriktion der Bauchorgane eintritt.

Wenn die Auffassung richtig ist, daß der Zustand der Blutgefäße einer der hauptsächlichsten Faktoren ist, welche den Blutdruck aufrechterhalten und verändern, so müßte bei den Versuchen mit Azetylcholin nicht Erniedrigung, sondern Erhöhung des Blutdrucks eintreten, da das große Gefäßgebiet des Splanchnicus stark und aktiv zusammengezogen ist. Dieses jedoch wird nicht beobachtet, sondern es tritt trotz der Vasokonstriktion der Bauchorgane immer Absinken des Blutdrucks ein. Es ist klar, daß in solchen Fällen die Ursache für die Veränderung im Niveau des Blutdrucks bei einem anderen Faktor, der den Blutdruck bedingt, gesucht werden muß, keinesfalls aber in den Veränderungen, die in den Blutgefäßen eintreten. Und in der Tat halten Klisiecki und Holobut[4] bezüglich des Histamins aufrecht, daß der Hauptfaktor, der das Fallen des Blutdrucks verursacht, Veränderung in der Herztätigkeit ist.

In der vorliegenden Arbeit, die auf ein größeres Versuchsmaterial — mehr als 100 Hunde — gestützt ist, haben wir es uns zum Ziele gesetzt,

in Ergänzung einiger früherer Veröffentlichungen von uns, gleichzeitig die Veränderungen in zwei großen Gefäßgebieten — den Bauchorganen und den Extremitäten — einerseits zu untersuchen und andererseits die Veränderungen im Niveau des Blutdrucks, die nach Anwendung einer Reihe von Stoffen, wie Histamin, Azetylcholin, Veritol, Vasopressin, Hypophysin, Ergotamin, Ephedrin, Adrenalin, Sympatol, Nicotin u. a., ferner auch nach Reizung des Rückenmarks und einiger Nerven, eintreten. Ferner ist es unsere Aufgabe festzustellen, wer der Hauptfaktor ist, der die für diese Stoffe bekannten Veränderungen im Blutdruck hervorruft.

Histamin. Wirkung auf die Blutgefäße und die Herztätigkeit.

Weitverbreitet ist die Ansicht, nach der das Histamin Vasodilatation der Innenorgane, der Muskulatur, der Haut usw. hervorruft und nach dem infolgedessen Abfall des Blutdrucks eintritt. Diese Ansicht wird auch von den in der letzten Zeit angestellten Forschungen von Mateeff und Schneider[5] unterstützt; diese Verfasser finden, daß die Hauptursache für den Histaminschock die Dilatation der Blutgefäße der Muskulatur ist.

Klisiecki und Holobut[4] gelangen bei ihren Versuchen, bei denen sie den modifizierten Photohämotachometer von Cybulski benutzen, zu entgegengesetzten Ergebnissen. Sie haben in keinem einzigen Falle Erweiterung der Gefäße nach intravenöser Anwendung von Histamin beobachtet, sondern regelmäßig Zusammenziehung der Blutgefäße. Infolgedessen lehnen die beiden Verfasser die bisherige Behauptung ab, daß es die Veränderung in den Blutgefäßen ist, die das Fallen des Blutdrucks, das nach Anwendung von Histamin eintritt, bedingt; sie nehmen an, daß die Ursache für dieses Fallen des Blutdrucks die Veränderung ist, die in der linken Herzkammer eintritt.

Bei dem Versuch an Hunden haben Orahovats und Gotsev[6] Zusammenziehung der Milz und Vasokonstriktion des Dünndarms nach intravenöser Einverleibung von Histamin festgestellt.

Bei unseren Versuchen untersuchten wir den Zustand der Blutgefäße zweier großer Gefäßgebiete der Bauchorgane (Dünndarm, Milz und Nieren) und der Extremitäten. Gleichzeitig hiermit wurde auch der Blutdruck untersucht. Zur Untersuchung der Veränderungen in dem Zustand der Blutgefäße benutzten wir den Onkographen von Orahovats und Popoff[7], und zu derjenigen der Extremitäten einen besonders zu diesem Zweck angefertigten Plethysmographen, der die Form und die Größe der entsprechenden Extremität hat. Der Blutdruck wurde nach der klassischen Methode von Ludwig mit offenem Quecksilbermanometer gemessen und registriert.

Die Versuche wurden an 38 Hunden beiderlei Geschlechts von mittlerer Größe 6—16 kg schwer angestellt. Die meisten von ihnen waren mit

Luminalnatrium narkotisiert worden, wenige zur Kontrolle mit Morphinäther. Es wurde Histamin „Roche", Ampullen von 1 mg, in Originalpackungen verwendet.

Technik. Nachdem das Tier narkotisiert worden ist, schert man die Haut der Extremität in der Gegend des Schenkels und fettet mit einer dicken Schicht Vaseline ein, wozu man zwecks Erlangung größerer Dichte etwas aufgelöstes Wachs hinzufügt. Man steckt das Bein in den Plethysmographen, durch die Öffnung der Gummimembran, die am offenen Ende des Plethysmographen aufgespannt ist. Die Gummimembran und der außen gebliebene Teil des Beines werden ebenfalls mit einer dicken Vaseline-Wachsschicht bedeckt, so daß das Bein von allen Seiten umschlossen ist. Nachdem der Plethysmograph mit auf 30° C gewärmter Ringerscher Lösung gefüllt worden ist, verschließt man die eine, am obigen Ende des Plethysmographen befindliche Öffnung, während man die andere, nahe der ersteren liegende Öffnung vermittels einer dickwandigen Gummiröhre mit der Kapsel von Marey verbindet. Auf diese Weise ist die Extremität in dem Plethysmographen eingeschlossen, ohne daß ihr Blutkreislauf gestört wäre. Die Veränderungen, die in dem Umfang der Extremität eintreten, und die nur von Veränderungen ihrer Blutversorgung herrühren können, wirken sich auf die Kapsel von Marey aus.

Hiernach nimmt man einen Einschnitt längs der Mittellinie des Bauches vor, öffnet die Bauchhöhle und nimmt vorsichtig einige oder alle Darmschlingen heraus, die man in den in Berührung mit dem Hauteinschnitt und den in entsprechende Höhe gestellten Onkographen bringt. Den Hylus des Dünndarms legt man auf eine dicke Schicht Vaseline, die auf den Hylus des Onkographen gegeben wurde, so daß die Blutversorgung des Dünndarms normal bleibt. Der Onkograph wird mit einem Deckel und speziellen Schrauben geschlossen. Durch die eine Öffnung des Deckels gießt man auf 38° C erwärmte Ringersche Lösung und verschließt dieselbe Öffnung mit einer Klemme, und die andere Öffnung wird vermittels eines dickwandigen Gummischlauchs mit einer anderen Kapsel von Marey verbunden. Die Schreibspitzen der beiden Kapseln stellt man so, daß sich die eine unter der anderen befindet, und zwar in einer senkrechten Linie mit der Schreibspitze des Quecksilbermanometers. Die drei Spitzen berühren gleichzeitig die Trommel des Kymographs. Auf diese Art und Weise kann man auch die Zeit des Eintritts einer gegebenen Veränderung im Zustande der Gefäße und des Blutdrucks beurteilen. Man versetzt den Kymographen in langsame Bewegung und registriert das Ausgangsniveau des Blutdrucks und der Gefäße des Dünndarms und der Extremität. Es muß erwähnt werden, daß bei guter Handhabung die Pulsierungen der Blutgefäße wiedergegeben und von den Kapseln als kleine Zacken registriert werden. Wenn die Apparate Flüssigkeit ausströmen oder wenn Luft in sie hineindringt, so erkennt man dies an den Kapseln deren Spitzen ihre Lage plötzlich verändern. In solchem Falle ist der Versuch hinfällig. Der Dünndarm kann nicht wieder berührt werden; man muß sehr vorsichtig mit ihm manipulieren.

Auf dieselbe Art und Weise werden die Veränderungen, die in der Milz und in den Nieren eintreten, erforscht. Zu diesem Zwecke ergreift man behutsam mit der Hand die Milz und bringt sie in einen entsprechend großen Onkographen, der den Bauchschnitt von links berührt. Man füllt den Onkographen mit Ringerscher Lösung auf dieselbe Weise und schließt ihn, indem man ihn mit der Kapsel von Marey verbindet. Dasselbe gilt auch für die rechte Niere, die man in einen anderen Onkographen bringt. Zur Untersuchung der Umfangveränderungen der Niere sind weibliche Tiere mit weichen, entspannten Bauchwänden am besten geeignet. Damit man Zugang zu der Niere erhält und diese ohne Zerrung in den Onkographen bringen kann, nimmt man einen Seitenschnitt der Bauchwand in der Richtung zur Niere selbst vor.

Nachdem man das Ausgangsniveau des Blutdrucks und den Umfang der Organe registriert hat, injiziert man in die V. jugularis ext. die entsprechende Dosis Histamin, und bei ununterbrochener Bewegung des Kymographen werden die eintretenden Veränderungen verzeichnet. Gewöhnlich injiziert man das Histamin in einer Dosis von $^1/_{50}$- $^1/_{200}$ mg auf 1 kg Lebendgewicht. In einigen Fällen wurden einem Tier bis zu 0,5 mg Histamin injiziert. Bei einigen Versuchen wurde das Histamin Gedeon Richter mit demselben Ergebnis wie „Roche" verwendet.

Ergebnisse.

Nach der Einspritzung von Histamin in die V. jugularis ext. beginnt im Verlaufe von 2—4 Sekunden die bekannte langsame Erniedrigung des Blutdrucks. Gleichzeitig hiermit oder 1—2 Sekunden später tritt Zusammenziehen der untersuchten Blutgefäße ein: des Dünndarms, der Nieren, der Extremitäten und Zusammenziehung der Milz. Das Zusammenziehen der Gefäße tritt verhältnismäßig schnell ein und erreicht in einigen Sekunden seinen Höhepunkt. Wenn der Blutdruck zu seinem Niveau allmählich zurückzukehren beginnt, fangen die Gefäße der Extremitäten an, sich auszudehnen und mehr Blut in sich aufzunehmen, während die Gefäße des Dünndarms im Verlaufe längerer Zeit zusammengezogen bleiben. Die letzteren fangen später an, sich auszudehnen, doch in keinem Falle später, als die Wiederherstellung des anfänglichen Niveaus des Blutdrucks eintritt. Während der Zeit, wo der Blutdruck niedrig ist, bleibt die Milz zusammengezogen und beginnt sich allmählich auszudehnen, wenn der Blutdruck sein anfängliches Niveau wieder einzunehmen beginnt. Nur in seltenen Fällen bleibt die Milz zusammengezogen bis zur völligen Wiederherstellung des normalen Niveaus des Blutdrucks. Ein solcher Fall ist auf Abb. 1 dargestellt, wo das Zusammenziehen der Milz länger dauert als der herabgesetzte (niedrige) Blutdruck. Die Blutgefäße der Extremitäten erleiden in allen Fällen ohne Ausnahme eine Zusammenziehung, die

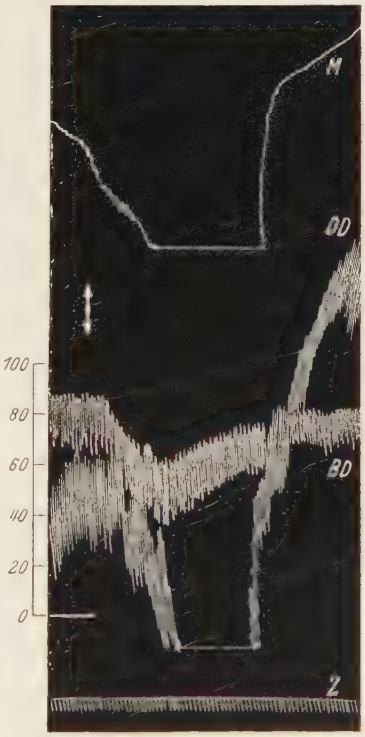


Abb. 1. 21. VII. 39. Hund, 16 kg, ♂. *M* = Milzvolumen, *BD* = Blutdruck in der A. carotis, *DD* = Dünndarmvolumen, *0* Blutdrucknullniveau. *Z* = Zeit in Sekunden. Bei ▲▼ wurde 0,1 mg Histamin „Roche" in die V. jugularis ext. injiziert.

parallel mit der Veränderung im Niveau des Blutdrucks verläuft. Die Blutgefäße des Dünndarms zeigen nur in seltenen Fällen eine sekundäre Erweiterung, die unmittelbar nach dem Verschwinden der anfänglichen Vasokonstriktion auftritt (Abb. 1). In den meisten Fällen jedoch geht die Vasokonstriktion des Dünndarms allmählich, ohne jede nachfolgende Dilatation, vorüber.

Abb. 2 zeigt einen anderen Versuch an einem Hund, wo unter dem Einfluß des Histamins Vasokonstriktion des Dünndarms und der Extremitäten eintritt. Im Verlaufe von 3—4 Sekunden zeigt sich stark ausgeprägte Zusammenziehung der Blutgefäße des Dünndarms, demzufolge

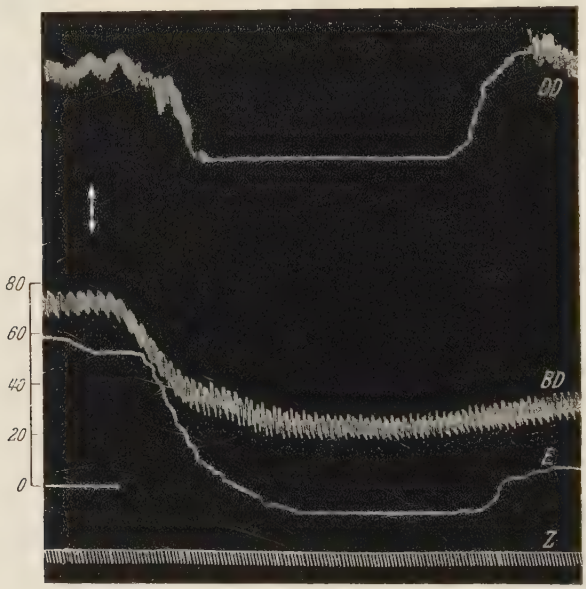


Abb. 2. 7. VII. 39. Hund, 10 kg, ♀. *DD* = Dünndarmvolumen, *BD* = Blutdruck in der A. carotis, *E* = Extremitätsvolumen, *O* = Blutdrucknullniveau, *Z* = Zeit in Sekunden. Bei ↕ wurde 0,1 mg Histamin „Roche" in die V. jugularis ext. injiziert.

die Kapsel von Marey sich meistmöglich zusammenzieht und der Hebel (die Schreibspitze) bis zum Grund der Kapsel selbst fällt und später eine horizontale Linie verzeichnet.

In keinem einzigen Falle verursachte die intravenöse Einspritzung von Histamin Vasodilatation des Dünndarms, der Niere oder der Extremitäten, noch rief sie Erhöhung des Milzumfanges hervor.

Eine Frage von Interesse ist, welcher Art die Zusammenziehung der Blutgefäße ist. Handelt es sich in diesem Falle nur um ein passives Zusammenziehen der Blutgefäße infolge Abfall des Blutdrucks, oder tritt auch eine aktive Veränderung in ihnen ein? Was die Veränderung in den Blut-

gefäßen der Extremitäten betrifft, kann man sagen, daß sie rein passiven Charakters ist. Was Form und Zeitdauer dieser Veränderung betrifft, so ähnelt sie in großem Maße der Blutdruckveränderung selbst, und dies liefert die Ursache, anzunehmen, daß sie passiv ist, bedingt durch den herabgesetzten Blutdruck. Bezüglich der Zusammenziehung der Blutgefäße des Dünndarms und der Nieren und der Zusammenziehung der Milz kann man die Frage, ob es sich um eine aktive Veränderung handelt, schwer beantworten. Mit plethysmographischen Forschungen an der Milz des Hundes finden Ferguson, Ivy und Greengard[8], daß die Zusammenziehung der Milz durch Histamin nur mit Senkung des Blutdrucks verbunden ist. Die Veränderungen, die wir in den erwähnten Organen beobachtet haben und besonders die in den Gefäßen des Dünndarms sind anhaltender als die in den Gefäßen der Extremitäten. Durch die Versuche erhält man den Eindruck, daß es sich bis zu einem gewissen Grade um ein aktives Zusammenziehen der Gefäße des Dünndarms und aktives Zusammenziehen der Milz handelt. Dies wird auch durch diejenigen Ergebnisse bekräftigt, die man in den Fällen beobachtete, in denen kleine Dosen Histamin eingespritzt wurden. In diesen Fällen tritt, trotz des unbedeutenden Abfalls des Blutdrucks, doch eine stark ausgeprägte Zusammenziehung der Blutgefäße des Dünndarms und eine ebensolche Zusammenziehung der Milz ein (Abb. 1). Immerhin bedarf diese Frage weiterer Forschung.

Aus dem bisher Dargelegten geht klar hervor, daß das Histamin, unabhängig von der angewandten Dosis, Vasokonstriktion des Dünndarms, der Nieren, der Extremitäten und Zusammenziehen der Milz verursacht. Sowohl bei der Anwendung größerer Dosen wie auch bei der Verwendung geringerer treten ein und dieselben Veränderungen (Zusammenziehen der Gefäße) ein. Mehrfaches hintereinander vorgenommenes Einspritzen von Histamin ruft immer Vasokonstriktion hervor.

Ganz anders ist es, wenn vor der Injizierung von Histamin irgendein anderer Stoff eingespritzt worden ist. Wenn z. B., vor der Einspritzung von Histamin, in die Vene des Tieres Veritol eingeführt wird, so verursacht die darauffolgende Einspritzung von Histamin Dilatation des Dünndarms und nicht Zusammenziehung wie in dem Falle, in dem nur Histamin eingespritzt wird. Eine solche Veränderung in der Art des Reagierens seitens der Blutgefäße des Dünndarms tritt auch in denjenigen Fällen ein, in denen der Einspritzung von Histamin eine solche von Adrenalin, Azetylcholin, Tonephin, Ephetonin, Ergotamin, Hypophysin, Nikotin, Atropin u. a. vorausgeht. In allen diesen Fällen ruft das Histamin, wenn es nach vorübergegangener Wirkung des zuerst injizierten Stoffes eingespritzt wird, Vasodilatation des Dünndarms, Vasokonstriktion der Nieren und der Extremitäten und Zusammenziehen der Milz hervor. Die Milz und die Gefäße der Nieren und der Extremitäten verändern die Art ihres Reagierens auf das Histamin nicht. Unabhängig davon, ob vor dem Histamin irgendein anderer Stoff eingespritzt worden ist oder nicht, ziehen sich die Blutgefäße

der Nieren, der Extremitäten und die Milz zusammen. Die Größe der Dosis des vor dem Histamin injizierten Stoffes hat keine besondere Bedeutung für die Art, in der die Blutgefäße des Dünndarms reagieren. Sowohl in den Fällen, in denen kleine Dosen (Veritol 2 mg, Azetylcholin 1 -2 mg, Ephetonin 5 cg pro Tier usw.) verabfolgt wurden, wie auch in denen von Injizierung größerer Dosen ruft das darauf folgende Einspritzen von Histamin Vasodilatation des Dünndarms hervor. Bei unseren Versuchen wurde das Histamin eingespritzt, nachdem die Wirkung des vorher injizierten Stoffes vergangen war — nach 10—15 Minuten. Bei einem Versuch wurde das Histamin 1 Stunde nach der Einspritzung von 4 mg Veritol „Knoll" (0,2 ccm aus Ampulle) injiziert. Auch in diesem Falle rief das eingespritzte Histamin eine, wenn auch leichte, Dilatierung der Gefäße des Dünndarms hervor.

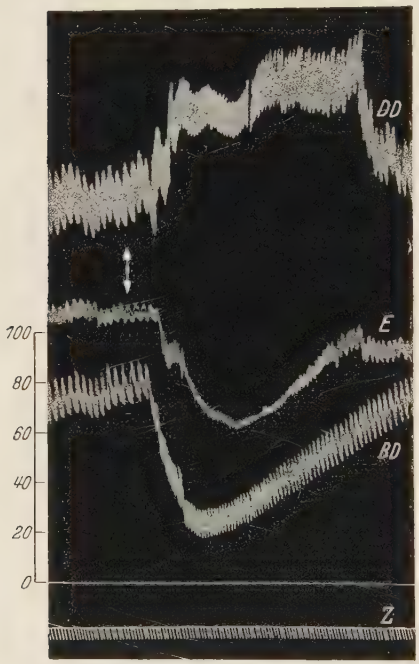


Abb. 3. 13. VI. 39. Hund, 12 kg, ♀. *DD* = Dünndarmvolumen, *E* = Extremitätsvolumen, *BD* = Blutdruck in der A. carotis, *O* = Blutdrucknullniveau, *Z* = Zeit in Sekunden. Bei ↕ wurde 0,1 mg Histamin „Roche" in die V. jugularis ext. injiziert. 10 Min. vorher ist 0,1 mg Adrenalin eingespritzt worden.

Abb. 3 stellt einen Versuch dar, bei dem 10 Minuten nach Einspritzung von 0,1 mg Adrenalin 0,1 mg Histamin injiziert wurde; als Resultat hiervon stellte sich Vasodilatation des Dünndarms und Vasokonstriktion der Extremität ein. Die Einspritzung von Histamin zu Anfang des Versuchs vor dem Adrenalin hat Vasokonstriktion des Dünndarms und der Extremität hervorgerufen.

Woher rührt diese Veränderung in der Art des Reagierens der Blutgefäße des Dünndarms? Diese Frage ist vorläufig schwer mit Bestimmtheit zu beantworten. Es ist klar, daß es sich um eine Umstimmung der Gefäße handelt, auf ein und denselben Stoff in anderer Weise zu reagieren. Diese Umstimmung der Gefäße tritt sowohl in den Fällen ein, in denen der vor dem Histamin eingespritzte Stoff an und für sich Vasodilatation des Dünndarms hervorruft, wie es bei Adrenalin, Veritol, Ephetonin u. a. der Fall ist, wie auch in denjenigen Fällen, in denen der vorher eingespritzte Stoff Vasokonstriktion des Dünndarms hervorruft, wie dies bei der Injizierung von Vasopressin, Azetylcholin, Nikotin u. a. beobachtet wird. Aus obigem geht klar her-

vor, daß die Art, in welcher der eingespritzte Stoff auf das Niveau des Blutdrucks wirkt, von keiner besonderen Bedeutung ist. Die Veränderung in der Reaktion der Gefäße des Dünndarms tritt sowohl in den Fällen, in denen der vor dem Histamin injizierte Stoff Fallen des Blutdrucks verursacht, wie auch in denjenigen, in denen er Erhöhung des Blutdrucks hervorruft, ein. Sogar in den Fällen, in denen der vorher eingespritzte Stoff (Veritol) Erhöhung des Blutdrucks bewirkt und der Blutdruck auf andere Weise herabgesetzt wird, z. B. indem man das Tier einige Tropfen Chloroform einatmen läßt, verursacht die darauffolgende Injizierung von Histamin wieder Vasodilatation, trotzdem der Blutdruck im Augenblicke der Einspritzung von Histamin verhältnismäßig viel niedriger ist, und trotzdem er sich dem Nullpunkt des Quecksilbermanometers sehr nähert. Von Interesse ist in diesem Falle die Tatsache, daß, selbst wenn der Blutdruck in der A. carotis sehr fällt, die Blutgefäße des Dünndarms sich aktiv erweitern.

In denjenigen Fällen, in denen die vorhergehende Einspritzung eines Stoffes 3 Stunden vor der Injizierung des Histamins vorgenommen wurde, veränderte das letztere die Art des Reagierens seitens der Blutgefäße des Dünndarms nicht. Das darauffolgende Injizieren von Histamin verursacht in solchem Falle Vasokonstriktion des Dünndarms.

In allen denjenigen Fällen, in denen das nachfolgende Injizieren von Histamin Vasodilatation des Dünndarms verursacht, beobachtet man eine Verschiedenheit in der Art des Reagierens seitens der einzelnen Gefäßgebiete: während die Gefäße des Dünndarms erweitert sind, sind die der Extremitäten, die der Nieren und die Milz zusammengezogen.

Welchen Einfluß auf das Ausmaß der Blutdrucksenkung hat die Vasodilatation des Dünndarms? Tritt ein größeres Fallen des Blutdrucks in den Fällen ein, in denen die Blutgefäße des Dünndarms sich erweitern? Zur Klärung dieser Frage wurden durch einige Versuche die Veränderung in den Blutgefäßen des Dünndarms und das Ausmaß der Blutdrucksenkung nach der alleinigen Einspritzung von Histamin und nach dem Injizieren derselben Dosis Histamin einige Minuten nach Einspritzung irgendeines genannten Stoffes untersucht. Es wurde festgestellt, daß das Ausmaß der Blutdrucksenkung nicht abhängig von dem Zustand der Blutgefäße des Dünndarms ist. Der Druck fällt auf das der angewandten Dosis entsprechende Niveau, unabhängig davon, ob die Gefäße des Dünndarms sich zusammenziehen oder erweitern.

Welche Bedeutung hat der funktionelle Zustand der Blutgefäße für die Veränderung im Blutdruck, die nach intravenöser Einspritzung von Histamin eintritt? In keinem unserer Versuche kann das Fallen des Blutdrucks in ursächliche Abhängigkeit von den Veränderungen, die in den beiden großen Gefäßgebieten — Splanchnicus und Muskulatur — eintreten, gebracht werden. Das Zusammenziehen der Blutgefäße müßte zur Erhöhung des Blutdruckes führen, was nie beobachtet worden ist, und die

Senkung des Blutdrucks müßte von Erweiterung der Gefäße begleitet sein, wie früher angenommen wurde. Dilatation der Gefäße haben wir jedoch nicht beobachtet. Eine Ausnahme macht nur der Dünndarm und zwar nach vorheriger Einspritzung eines anderen Stoffes.

Zur Erklärung der Senkung des Blutdrucks kann man annehmen, daß in dem anderen von uns nicht erforschten Gefäßgebiet Dilatation eintritt, und zwar eine solche, die das Zusammenziehen der Gefäße des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten und das Zusammenziehen der Milz kompensiert und imstande ist, den Blutdruck auf das gegebene Niveau zurückzuführen. Klisiecki und Holobut haben bei ihren Versuchen ein Gefäßgebiet, das sich erweitern würde, nicht gefunden.

Versuche mit Evisceratio an den Tieren.

In dem Wunsche, auch auf einem anderen Wege festzustellen, welchen Anteil die Blutgefäße der Bauchorgane an dem Fallen des Blutdrucks durch das Histamin nehmen, erforschten wir durch einige Versuche die Wirkung des Histamins auf das Ausmaß des Blutdrucks vor und nach Evisceratio an den Tieren und verglichen die Ergebnisse von der Wirkung zweier gleicher Dosen, die vor und nach der Evisceratio angewendet wurden.

Die Technik war folgende: Nachdem das Ausgangsniveau des Blutdrucks verzeichnet wird, injiziert man eine bestimmte Dosis ($^1/_{10}$ mg) Histamin und registriert die Veränderung im Niveau des Blutdrucks. Danach öffnet man den Bauch mit einem Einschnitt längs der Mittellinie desselben und nimmt zwischen zwei Unterbindungen nacheinander die inneren Organe heraus: Magen, Darm, Bauchspeicheldrüse, die beiden Nieren und die Milz. Danach drückt man mit zwei Klammern die Blutgefäße, die in die Leber hinein und aus ihr herauskommen, zusammen und schließt auf diese Weise die Leber von dem Blutkreislauf aus. Wenn das Evisceratio am Tiere schnell und ohne Blutverlust ausgeführt wird, so behält der Blutdruck sein normales Niveau bei oder zeigt nur unbedeutende Veränderungen. Danach registriert man von neuem das Ausgangsniveau des Blutdrucks und injiziert wieder dieselbe Dosis Histamin in die Vene des gleichen Tieres und verzeichnet die eintretende Veränderung im Niveau des Blutdrucks.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß die Erniedrigung des Blutdrucks bei gleichen Dosen Histamin in beiden Fällen vor und nach der Eviscerierung der Tiere gleich ist. Bei unseren Versuchen konnte absolut kein Unterschied in der Wirkung des Histamins auf den Blutdruck vor und nach Eviscerierung der Tiere bemerkt werden.

Versuche mit Verkürzung des großen Blutkreislaufes.

Um festzustellen, welchen Anteil an der Herabsetzung des Blutdrucks durch Histamin die Blutgefäße des Körpers außerhalb der Gegend von Splanchnicus haben, untersuchten wir mit anderen Versuchen an einigen Tieren die Wirkung des Histamins nach Verkürzung des Blutkreislaufs des Tieres.

Technik. Nach Öffnung des Brustkorbes des Tieres (Heparin und künstliche Atmung!) nimmt man Verbindung vermittels eines Gummischlauches zwischen Art. anonyma und Aorta descendens oberhalb des Zwerchfells vor. Alle Gefäße, die zum Kopfe und zu den oberen Extremitäten führen, werden unterbunden. Man unterbindet auch die Vena cava superior. Nach Öffnung des Bauches unterbindet man die Aorta abdominalis und Vena cava inferior unmittelbar unter dem Sitz der Nierengefäße. Bei einer solchen Verkürzung des großen Blutkreislaufs fließt das Blut aus der Aorta ascendens durch den Gummischlauch in einen kleinen Teil der Aorta abdominalis und von dort aus in die Bauchorgane. Das Blut der letzteren fließt durch den übrigen Teil der Vena cava inferior und erreicht das rechte Herz. Man kann sagen, daß bei einer solchen Verkürzung des Blutkreislaufs außer den Bauchorganen sehr wenig andere Gefäße in dem großen Blutkreislauf bleiben. In den meisten Fällen behält der Blutdruck bei schneller Manipulierung ein genügend hohes Niveau [1]. Der Blutdruck wird durch Einführung einer T-förmigen Kanüle in den mit dem Manometer verbundenen Gummischlauch gemessen. In dieselbe Kanüle injiziert man auch das Histamin.

Auch in diesen Fällen verursacht das Histamin Abfall des Blutdrucks, der betreffs Form und Ausmaß demjenigen gleich ist, der bei Aufrechterhaltung des gesamten großen Blutkreislaufs beobachtet wird.

Aus diesen Versuchen geht klar hervor, daß die Ursache der Herabsetzung des Blutdrucks entweder in der Wirkung desselben auf die Blutgefäße der Lungen oder auf das Herz zu suchen ist.

Das Verhältnis zwischen dem Niveau des Blutdrucks und der Herztätigkeit.

Das Verhältnis zwischen den Veränderungen im Blutdruck und den Veränderungen in der Tätigkeit der linken Kammer wurde von Orahovats und Gotsev[6] in einer Reihe von Versuchen an Hunden untersucht. Zu diesem Zwecke wurden gleichzeitig das Tonogramm der linken Kammer und der Blutdruck in einer der großen Arterien-Carotis oder Femoralis registriert. Ohne den Brustkorb des Tieres zu öffnen, führt man durch einen der Zwischenrippenräume links in das linke Ventrikel den Tonographen, mit der Kapsel von Marey verbunden, ein. Die Schreibspitze des Tonographen bringt man über oder unter diejenige des Quecksilbermanometers, und zwar in einem senkrechten Niveau, so daß man die Wechselbeziehungen zwischen den eintretenden Veränderungen beurteilen kann. Bei langsamer Bewegung des Kymographen werden die einzelnen Tonogramme nicht in ihrer Gesamtheit, sondern nur in ihren Höhepunkten verzeichnet. Zu Anfang des Versuchs registriert man die Ausgangsniveaux des Blutdrucks und des Tonogramms. Danach injiziert man in die Vene des Tieres eine bestimmte Dosis Histamin und verzeichnet die eintretenden Veränderungen. Auf Abb. 4 ist das Ergebnis eines solchen Versuchs dargestellt. Man sieht, daß gleichzeitig mit der Herabsetzung des Blutdrucks auch eine Verringe-

[1] Die Technik wurde von Gotsev, Lueken u. Simmendinger in der Zschr. exper. Med. **100**, 81 (1936) ausführlich beschrieben.

rung der Herztätigkeit eintritt. Mit Verbesserung des Blutdrucks beginnt auch eine allmähliche Erhöhung der Herztätigkeit. Wenn der Blutdruck sein Anfangsniveau erreicht, so wird das Ausmaß der Herztätigkeit demjenigen, das vor Einführung von Histamin bestanden hat, gleich. In allen untersuchten Fällen hat man eine völlige Abhängigkeitsbeziehung zwischen den Veränderungen in der Herztätigkeit und den Veränderungen in dem Niveau des Blutdrucks festgestellt. In dieser Beziehung bestätigen die Versuche vollkommen den von Klisiecki und Holobut vertretenen Standpunkt, daß der linke Ventrikel der Herdsitz des Histaminschocks ist.

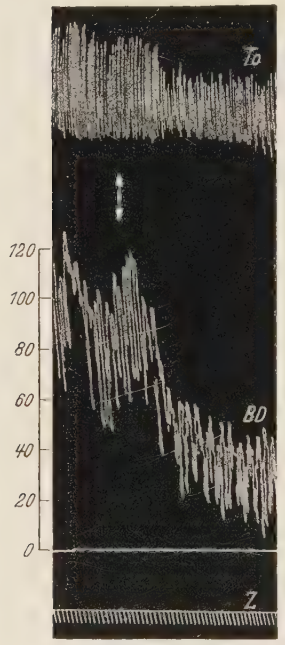


Abb. 4. 27. VII. 39. Hund, 16 kg, ♂. *To* = Tonogram der linken Kammer, *BD* = Blutdruck in der A. carotis, *0* = Blutdrucknullniveau, *Z* = Zeit in Sekunden. Bei ⇕ wurde 0,3 mg Histamin „Roche" in die V. jugularis ext. injiziert.

Zusammenfassung.

In Versuchen an 38 Hunden wurden die Veränderungen in der Blutversorgung zweier großer Gefäßgebiete — Bauchorgane und Extremitäten —, die Veränderungen im Blutdruck und die in der Herztätigkeit nach intravenöser Injizierung von Histamin eintretenden Veränderungen erforscht.

Man kam zu folgenden Ergebnissen:

1. Das Histamin verursacht in Dosen von $^1/_{50}$—$^1/_{200}$ mg wie auch in größeren Dosen Vasokonstriktion des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten und Zusammenziehung der Milz. Nicht in einem einzigen Falle wurde Vasodilatation beobachtet.

2. In denjenigen Fällen, in denen der Injizierung von Histamin die Einspritzung eines anderen Stoffes, wie Veritol, Adrenalin, Azetylcholin, Tonephin, Ephetonin, Ergotamin, Hypophysin, Nikotin, Atropin u. a., vorausging, verursachte das Histamin Vasodilatation des Dünndarms, Vasokonstriktion der Nieren und der Extremitäten und Zusammenziehen der Milz. Die Art, auf welche die Blutgefäße des Dünndarms reagieren, ändert sich.

3. Dieselben Dosen Histamin rufen gleiches Fallen des Niveaus des Blutdrucks bei ein und demselben Tier vor und nach Eviscerierung des letzteren hervor.

4. Bei Tieren mit verkürztem Blutkreislauf, bei denen nur die Blutversorgung der Lungen und der Bauchorgane beibehalten ist, ver-

ursacht das Histamin eine Senkung des Blutdrucks, die dem eines unversehrten Tieres gleich ist.

5. Die Veränderungen im Zustand der Blutgefäße, die nach Histamin eintreten, können das Fallen des Blutdrucks nicht erklären.

6. Die gleichzeitige Registrierung des Blutdrucks und des Tonogramms des Ventrikels zeigt, daß sich der Blutdruck in Abhängigkeit von den Veränderungen in der Herztätigkeit ändert. Das Fallen des Blutdrucks wird von entsprechender Verringerung der Herztätigkeit begleitet. Die Verbesserung des Blutdrucks und Rückkehr zu seinem normalen Niveau geht mit der Verstärkung der Herztätigkeit bis zum anfänglichen Ausmaß Hand in Hand. Es besteht ein völliges Abhängigkeitsverhältnis zwischen der Herztätigkeit und dem Blutdruck.

Die Ursache für die Senkung des Blutdrucks durch Histamin liegt in den eintretenden Veränderungen der Herztätigkeit.

Literatur.

1) Orahovats, D. P., u. T. Gotsev: Pflügers Arch. **235**, 367 (1935). — 2) Sturm, A., u. H. Dauter: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 368 (1937). — 3) Gotsev, T.: Ebenda **181**, 207 (1936). — 4) Klisiecki, A., u. W. Holobut: Ebenda **186**, 57 (1936). — 5) Mateeff, D., u. M. Schneider: Pflügers Arch. **236**, 606 (1935). — 6) Orahovats, D. P., u. T. Gotsev: Jahrb. Mediz. Fakultät, Sofia, **18**, 191 (1939). — 7) Orahovats, D. P., u. S. Popoff: Ebenda **10**, 109 (1931). — 8) Ferguson, I., A. C. Ivy u. H. Greengard: Amer. J. Physiol. **117** 701 (1936).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Über den Abbau von Oxytocin und Vasopressin in vitro.

Von

Mathilde Christlieb*.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Oktober 1939.)

In der Frühzeit der Hypophysenhinterlappen-Forschung glaubte man mit einer verwirrenden Fülle von Wirkungen des Hinterlappens (HHL.) rechnen zu müssen. Erst seit es gelungen ist, einigermaßen reine Extrakte aus dem HHL. herzustellen, ließen sich allmählich vier nur dem HHL. eigentümliche Wirkungen abgrenzen: Eine blutdruckerhöhende (Vasopressin), eine uteruserregende (Oxytocin), eine harnhemmende und eine harnfördernde. Zeitweise schien es, als könne man Vasopressin der harnhemmenden, Oxytocin der harnfördernden Komponente gleichsetzen (1): heute aber erscheint diese Frage noch unentschieden.

Als nächstes war die Natur der beteiligten Wirkstoffe, ihr Verhältnis zueinander und ihr Schicksal im Organismus zu klären. Über das Verhalten intravenös injizierter Hypophysenhinterlappen-Extrakte (HHE.) im kreisenden Blut ist soviel bekannt: Der größte Teil verschwindet in etwa 30 Minuten aus der Blutbahn (2, 3, 4); bei hohen Dosen werden 25—30% der injizierten Menge durch die Nieren ausgeschieden (2, 3, 5). Einen Hinweis auf das Verhalten der übrigen 70% konnten nur Versuche in vitro geben. In ungerinnbar gemachtem, nicht erhitztem Blut läßt sich ein Wirkungsverlust nachweisen (2, 3, 5, 6), der für einzelne Tierarten verschieden ist und von Jones und Schlapp (3) mit 20—30% angegeben wird. Wenn man nicht in vivo eine ungleich schnellere Abbauwirkung des Blutes annehmen wollte, mußte man nach weiteren Möglichkeiten suchen, das schnelle Verschwinden von HHE. aus dem kreisenden Blut zu erklären. Man fand, daß Auszüge und Aufschwemmungen von Geweben HHE. zerstören, und zwar viel schneller als Blut (2, 3, 4). Über das Wesen dieser Zerstörungen sind die Meinungen geteilt. Es ist bekannt, daß HHE. durch Fermente zerstörbar ist, wobei Trypsin, Erepsin, Peptidasen und Tyrosinase in Frage kommen, daß er ferner gegen Oxydationen empfindlich ist und daß seine einzelnen Fraktionen leicht und verschieden stark durch anorganische Stoffe adsorbiert werden. Heller und Urban (2) trennen zwischen einer hitzelabilen, durch Tierkohle aus den Geweben entfernbaren Substanz, die

* D 11.

das antidiuretische Prinzip schnell und in einem für die einzelnen Organe konstanten Maße durch Adsorption inaktiviert und beim Kochen wieder entläßt, und einer enzymartigen Substanz in Blut und Leber, die HHE. langsam zerstört. Jones und Schlapp (3) berichten, daß ungekochte Glycerinextrakte von Leber, Niere und Milz Vasopressin und Oxytocin zerstören und daß die Extrakte diese Eigenschaft beim Kochen verlieren. Von einer Adsorption können diese Autoren nichts berichten. Dieser Widerspruch ist einstweilen ungeklärt: vielleicht spielt die Wahl der Methoden eine Rolle: errechnet man aus den angegebenen Versuchsbedingungen den Organgehalt der Aufschwemmungen und Auszüge in %, so ergibt sich, daß Jones und Schlapp mit 6%igen Glycerinextrakten, Heller und Urban aber mit fast 40%igen Aufschwemmungen und etwa 33%igen Auszügen mit physiologischer Kochsalzlösung gearbeitet haben. Larson (7) findet, daß Extrakte von Niere, Leber, Muskel und Blut Oxytocin und Vasopressin bei p_H 7.4 entsprechend ihrem Ereptasegehalt inaktivieren. Genauere Daten bringt er in einer späteren Arbeit (5) für Vasopressin: Dort schreibt er die HHE.-zerstörende, enzymatische Wirkung seiner Gewebsaufschwemmungen auf Grund von Trennungsversuchen der Aminopolypeptidase der Gewebsereptasen zu.

In den erwähnten Arbeiten — außer bei Larson (7) sowie Jones und Schlapp (2) — sind die Ergebnisse meist nur an einer Komponente des HHE. geprüft. Vergleichende Angaben bringen nur Jones und Schlapp (2) über das Verschwinden von Oxytocin und Vasopressin aus dem kreisenden Plasma: sie verhalten sich identisch. Über das Verhalten beider Komponenten bei Abbau in vitro fehlen solche Angaben. Die vorliegenden Versuche sollten im Anschluß an die Arbeit von Larson (5) Aufschluß darüber geben.

Methode.

Die verwendeten Organe stammten von Meerschweinchen, die durch Nackenschlag getötet und von der Brustaorta aus mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült wurden. Die Organe (Leber, Niere, quergestreifter Muskel und Dünndarm) wurden sofort entnommen, durch eine Organpresse getrieben (was keine sehr gleichmäßige Zerkleinerung gibt und bei Muskel sehr mühsam ist), der Brei gewogen und mit physiologischer Kochsalzlösung auf das Zehnfache verdünnt. Die eine Hälfte jeder Organaufschwemmung wurde fünf Minuten in kochendem Wasser erhitzt. Dann wurden [entsprechend der Versuchsanordnung bei Larson (5)] die gekochte und die ungekochte Aufschwemmung so auf zehn Kölbchen verteilt, daß diese in je 10 ccm Flüssigkeit eine 5-, 1-, 0.2- und 0.04%ige Aufschwemmung, je gekocht und ungekocht, enthielten (Tabelle 1). Jedes Kölbchen enthielt 4 ccm Sörensen-Phosphatpuffer vom p_H 7.17 und 1 ccm = 3 Einh. HHE. Verwendet wurde stets „Hypophysin"-Bayer, welches aus einer einzigen Herstellungsserie stammte und also Vasopressin und Oxytocin

Tabelle 1. Zusammensetzung der Aufschwemmungen.
Hyp. = Hypophysinvergleichslösung.

Gefäß	Puffer ccm	Physiologische NaCl-Lösung ccm	HHE., 1 ccm = 3 Einh. ccm	Aufschwemmungen 10 %, roh ccm	Aufschwemmungen 10 %, gekocht ccm
I	4		1	5	
II	4	4	1	1	
III	4	4,8	1	0,2	
IV	4	4,96	1	0,04	
V	4		1		5
VI	4	4	1		1
VII	4	4,8	1		0,2
VIII	4	4,96	1		0,04
IX	4	1		5	
X	4	1			5
Hyp.	4	5	1		

immer im selben Verhältnis enthielt; der Rest wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 ccm aufgefüllt und 2 Tropfen Toluol zur Konservierung zugegeben. Die anfängliche Konzentration war also in jedem Fall 30 Millieinheiten (mE.)/0,1 ccm. Zwei Kontrollproben enthielten 5%ige Gewebsaufschwemmung, gekocht und ungekocht, ohne Zusatz von HHE.

Die Kölbchen kamen 24 Stunden in den Brutschrank bei 37°. Danach wurden sie 5 Minuten in kochendes Wasser gestellt, abfiltriert und in den Eisschrank gebracht. Die zum Vergleich dienende HHE.-Lösung wurde ebenso behandelt. Dadurch sollte ein Fehler durch die mögliche (geringe) Wirkungsabnahme des HHE. im Brutschrank vermieden werden.

Auswertung.

Die Uteruswirkung wurde am Schafuterus im Tyrodebad nach der üblichen Methode von Trendelenburg (8) geprüft. Dabei zeigte sich, daß die Uteri bei einer Temperatur von 34° zuverlässiger waren und weniger spontan arbeiteten. Viele anfängliche Mißerfolge ließen sich durch sorgfältigeren Transport (Vermeiden von Druck, Wechseln der eisgekühlten Tyrode) ausschalten; es blieben aber auch dann noch genug Versager, bei denen der Grund der Unbrauchbarkeit wohl in dem Zustand der Uteri selbst zu suchen war.

Die Blutdruckwirkung wurde nach dem Vorschlag von Simon (9) an Ratten ausgewertet. Vorteile seiner Methode sind, daß erstens ein Fehler durch beigemischte blutdrucksenkende Substanzen vermieden wird, zweitens die Möglichkeit besteht, HHE.-Dosen in einem Abstand von höchstens 20 Minuten zu geben, ohne daß die Ansprechbarkeit für Vasopressin dadurch leidet. (Bei der dekapitierten Katze ist ein einstündiger Abstand der Injektionen nötig.) Die Ratten wogen durchschnittlich 250 g; sie wurden künstlich beatmet. Zur Erzielung eines niederen Blutdruckes, der die störende blutdrucksenkende Wirkung etwa vorhandenen Histamins

ausschließen soll, wurden aber die Tiere nicht wie bei Simon dekapitiert, sondern mit hohen Dosen Pernocton (400 mg/kg Ratte subcutan) narkotisiert. Die Erfolge waren dabei anfänglich gut, später wiesen plötzliches Absinken des Blutdruckes und einzelne Todesfälle darauf hin, daß so hohe Dosen Pernocton auch bei guter Beatmung nicht von allen Tieren vertragen werden. Zur Hemmung der Gerinnung wurde Heparin gegeben (30 mg kg Tier intravenös). Die Vagi wurden in den meisten Fällen durchschnitten. In die Carotis wurde eine Glaskanüle eingebunden, die mit einem Quecksilbermanometer verbunden war. Als Sperrflüssigkeit diente ein isotonisches Gemisch von $^2/_3$ Kochsalzlösung und $^1/_3$ Natriumcitratlösung. Die Injektionen erfolgten in die Jugularis externa. (Die jeweils injizierte Flüssigkeitsmenge war 0,1 ccm; sie hatte an sich keinen Einfluß auf den Blutdruck.)

Versuchsergebnisse.

Wertet man die nach der oben beschriebenen Methode gewonnenen Filtrate am Rattenblutdruck und Schafuterus aus, so ergibt sich (Tabelle 2):

Tabelle 2. Abbau von HHE. durch die einzelnen Aufschwemmungen.

Organgehalt der Aufschwemmungen:		5 %		1 %		0,2 %		0,04 %	
		I roh mE.	V gek. mE.	II roh mE.	VI gek. mE.	III roh mE.	VII gek. mE.	IV roh mE.	VIII gek. mE.
Leber	Auswertung am Uterus	—	< 15	< 15	~ 15	~ 15	30	30	30
	am Blutdruck	—	< 15	< 15	> 15	~ 15	30	30	30
	am Uterus	—	< 15	< 15	~ 15	~ 15		30	30
	am Blutdruck	—	< 15	—	> 15	> 15	< 15	30	30
Niere	Auswertung am Uterus	—	~ 15	< 15	> 15	> 15		30	30
	am Blutdruck	—	< 15	< 15	< 15	< 15		30	30
Darm	Auswertung am Uterus	—	< 15	—	> 15	> 15	30	30	30
	am Blutdruck	—	< 15	—		~ 15			
	am Blutdruck	—	< 15	(—)	> 15	> 15	30		30
Muskel	Auswertung am Uterus	< 15	~ 15			30		30	30
	am Blutdruck	< 15		> 15		30	30	30	30
	am Blutdruck	< 15	> 15	> 15		30	30	30	30

Es bedeuten: Die Zahl 30: 30 Millieinheiten (mE.)/0,1 ccm Flüssigkeit, also die volle zugegebene Menge HHE., die Zahl 15: 15 mE., also die Hälfte der zugegebenen Menge HHE., —: keine Wirkung, (—): fast keine Wirkung.

Die Filtrate einer 5%igen Aufschwemmung eines jeden Organs, gekocht wie ungekocht, hatten in einer Dosis von 0,1 ccm weder am Uterus noch am Blutdruck eine Wirkung.

Die Auswertung von Leber am Uterus zeigt, daß eine ungekochte 5%ige Aufschwemmung 30 mE. 0,1 ccm vollständig zerstört, eine 1%ige das Oxytocin auf weniger als die Hälfte, eine 0,2%ige es ungefähr auf die

Hälfte abbaut, während die 0,04%ige die oxytocische Wirkung unbeeinträchtigt läßt. In gekochtem Zustand reduzierte 5%ige Leberaufschwemmung die Uteruswirkung auf weniger als die Hälfte, 1%ige rund auf die Hälfte, 0,2- und 0,04%ige verminderten sie nicht. Die Auswertung am Blutdruck ergab bei gekochter und ungekochter Aufschwemmung das gleiche.

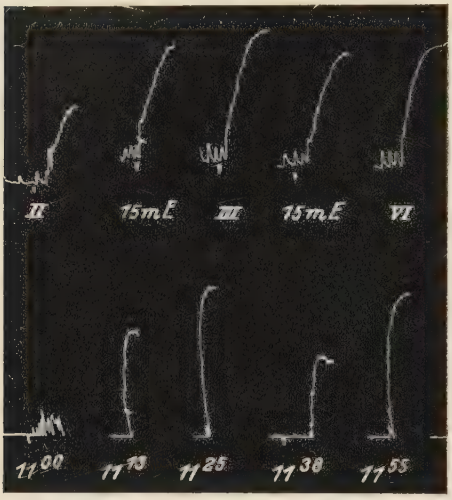


Abb. 1. Auswertung am Schafuterus (Doppelversuch). Wirkung von je 0,1 ccm Filtrat von Nierenaufschwemmung plus 30 mE., HHE, nach 24stündigem Einwirken. II: Aufschwemmung roh, 1%ig; III: roh, 0,2%ig; VI: gekocht, 1%ig; 15 mE.: Hypophysin-Vergleichslösung.

Bei Niere liegen die Verhältnisse ähnlich, nur zeigt die 0,2%ige Aufschwemmung etwas weniger Wirkung als die gleiche Menge Leber. Die Ergebnisse für Uterus- und Blutdruckwirkung stimmen überein (Abb. 1 und 2).

Dünndarm wirkt stärker, hier zerstört auch die 1%ige Aufschwemmung den zugegebenen HHE. völlig und die 0,04%ige ist noch etwas wirksam.

Am wenigsten ausgesprochen ist die Wirkung von Muskel: Auch die 5%ige Aufschwemmung zerstört die Uterus- und Blut-

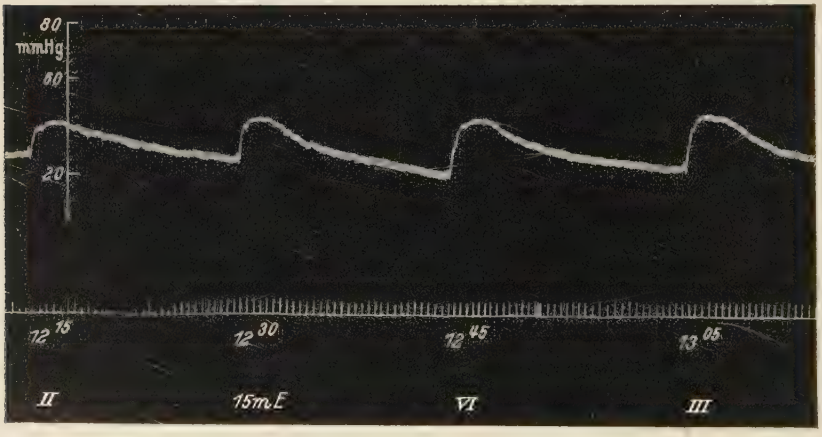


Abb. 2. Auswertung am Blutdruck, Ratte mit 250 g Gewicht in Pernoctonnarkose. II, III, VI, 15 mE. wie auf Abb. 1.

druckwirksamkeit nicht völlig. Die Ergebnisse der Auswertung am Uterus und Blutdruck stimmen auch bei Darm und Muskel überein.

Vergleicht man die einzelnen Daten, so sieht man eine gleichlaufende Zerstörung von Vasopressin und Oxytocin in allen Fällen. Ferner ergibt sich, daß die gekochten Aufschwemmungen schwächer wirken; größenordnungsmäßig kann man das Verhältnis etwa so ausdrücken, daß die gekochte Aufschwemmung etwa so stark wirkt wie ein Fünftel des gleichen Organs in ungekochtem Zustand.

Besprechung der Ergebnisse.

Die verschieden starke Wirksamkeit der einzelnen Organe ist, wie Larson (7) gezeigt hat, wahrscheinlich der Wirkung von Gewebsereptasen zuzuschreiben. Es ist anzunehmen, daß die Wirkung von Dünndarmschleimhaut diejenige von Leber weit übertrifft, da schon Dünndarm im ganzen wirksamer ist als Leber. Dies wird, bei der Annahme eines fermentativen Abbaues von HHE., aus dem hohen Ereptasegehalt der Dünndarmschleimhaut verständlich. Durch die Annahme einer fermentativen Zerstörung ist die Möglichkeit einer anfänglichen Adsorptionswirkung nicht ausgeschlossen, sie ist sogar wahrscheinlich; aber bei 24stündigem Einwirken von Gewebsaufschwemmungen wird sie durch die spätere enzymatische Zerstörung überdeckt und ist nicht mehr — etwa auf Grund einer Reaktivierung durch Kochen — nachzuweisen.

Merkwürdig ist die relativ starke Wirksamkeit der gekochten Aufschwemmungen; denn eine adsorptive Bindung wird ja nach Heller und Urban (2) durch Kochen fast völlig unmöglich gemacht und eine enzymatische Wirkung wird dadurch sicher ausgeschlossen. Meiner Meinung nach muß es sich wohl doch um Adsorption handeln, wenn diese auch sicher viel schwächer ist als bei der gleichen Aufschwemmung in ungekochtem Zustand, entsprechend der viel geringeren Oberflächenentwicklung des denaturierten Eiweißes. Zu denken wäre freilich noch an einen oxydativen Abbau bei den gekochten Aufschwemmungen.

Der gleichlaufende Abbau von Vasopressin und Oxytocin weist in dieselbe Richtung wie die Befunde früherer Autoren, die von einem parallelgerichteten Verhalten beider Komponenten sprechen. So Abel (10), der bei seinen hochwirksamen, gereinigten Präparaten die einzelnen Komponenten im gleichen Verhältnis fand wie im Ausgangsmaterial; Smith (11), der identische Diffusionsgeschwindigkeiten für oxytocisches und vasopressorisches Prinzip und gleichlaufende Zerstörung beider Komponenten bei hohen Temperaturen fand. Auch berichten Jones und Schlapp (3) von einem gleichartigen Verhalten von Vasopressin und Oxytocin in vivo und in vitro. Sie stellen fest: Obwohl man beide Stoffe in getrennten Fraktionen erhalten kann, haben sie doch auffallend ähnliche Eigenschaften. Das ist berechtigt und stimmt mit meinen Befunden überein. Aber daraus, wie z. B. Smith (11), auf eine chemische Identität dieser Komponenten

zu schließen, scheint nicht angängig. Stehen doch den Befunden von Abel (10), der die Wirkstoffe von HHE. im gleichen Verhältnis anreicherte, ebensoviele gegenüber, denen eine isolierte Anreicherung des einen oder anderen gelang (12, 13). Und parallelgehende Diffusionsgeschwindigkeiten und Zerstörbarkeit bei hohen Temperaturen weisen nur auf ähnliche Größenordnung und verwandten chemischen Aufbau hin. Daß sich aber Unterschiede doch finden lassen, das beweisen wieder die neuesten Arbeiten auf diesem Gebiet von du Vigneaud (14) und Mitarbeitern, sowie die von Heller (15). Du Vigneaud findet bei Elektrophoreseversuchen, daß das pressorische Prinzip sechsmal so schnell zur Kathode wandert wie das oxytocische. Heller schreibt, daß bei Prüfung der Stabilität gegen Erhitzen auf 99° bei verschiedenem p_H das oxytocische Prinzip gegenüber dem pressorischen weniger haltbar sei im stark Sauren und stark Alkalischen, haltbarer dagegen im p_H-Bereich von 2 bis 4,5. Durch diese Arbeit scheint übrigens auch die lange angenommene Identität von Vasopressin und antidiuretischem Prinzip wieder in Frage gestellt.

Demgegenüber lassen meine eigenen Versuche, bei denen ein Unterschied im Verhalten von Vasopressin und Oxytocin nicht zu sehen ist, keine weitergehenden Schlüsse zu: findet sich doch in zerquetschten Organen eine solche Fülle von Fermenten und möglichen Reaktionen, daß feinere Unterschiede zwischen zwei Substanzen, die größenordnungsmäßig und in ihrem chemischen Charakter verwandt sind, dabei nicht gefaßt werden können. Dazu kommt noch, daß man die Anwesenheit von HHE. ja immer nur an seinen Wirkungen erkennen kann und daß den biologischen Auswertungsmethoden, mit denen man diese Wirkungen nachweist, allein schon Fehler von rund 20% (16) anhaften. Deshalb erscheint es doppelt notwendig, möglichst genau definierte Versuchsbedingungen zu wählen (also in unserem Fall z. B. gereinigte Fermente), wenn man in der Klärung des Verhältnisses der einzelnen Komponenten von HHE. zueinander weiterkommen will.

Zusammenfassung.

1. Gewebsaufschwemmungen zerstören die Uterus- und Blutdruckwirksamkeit von Hypophysenhinterlappen-Extrakten.

2. Am stärksten wirkt Dünndarm; Leber und Niere wirken schwächer, am wenigsten wirksam ist quergestreifter Muskel.

3. Gekochte Aufschwemmungen mindern die HHE.-Wirkung schwächer (ungefähr so stark wie ein Fünftel der Menge des ungekochten Organs).

4. Das Verschwinden der Uterus- und Blutdruckwirkung geht in allen Versuchen im wesentlichen parallel.

Literatur.

1) Fraser, A. M.: J. Pharmacol. (Am.) **60**, 89 (1937). — 2) Heller, H., u. F. F. Urban: J. Physiol. (Brit.) **85**, 502 (1935). — 3) Jones, A. M., u. W. Schlapp: Ebenda **87**, 144 (1936). — 4) Simon, S., u. P. Zsoldos: Magy. orv. Arch. **39**, 694, (1939); zitiert nach Ber. Physiol. usw. **111**, 437 (1939). — 5) Larson, E.: J. Pharmacol. (Am.) **62**, 346 (1938). — 6) Whitehead: Amer. J. Physiol. **76**, 185 (1926). — 7) Larson, E.: J. Pharmacol. (Am.) **57**, 132 (1936). — 8) Trendelenburg, P.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **138**, 301 (1928). — 9) Simon, A.: Ebenda **187**, 672 (1937). — 10) Abel, J. J., Rouillier u. Geiling: J. Pharmacol. (Am.) **28**, 289 (1923). — 11) Smith, M. J., u. Wm. T. Mc Closky: Ebenda **24**, 391 (1925). — 12) Führer, H.: Biochem. Z. **76**, 232 (1916). — 13) Kamm, Aldrich, Grote, Rowe, Bugbee: J. amer. chem. Soc. **50**, I. 573 (1928). — 14) du Vigneaud V., Irving, Dyer u. Sealock: J. biol. Chem. (Am.) **123**, 45 (1938). — 15) Heller, H.: J. Physiol. (Brit.) **96**, 337 (1939). — 16) Burn, J. H.: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin 1937.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik, Jena. (Direktor: Prof. Dr. med. W. H. Veil.)

Albucid-Bilanzversuche bei internen Krankheitszuständen auf Grund des photometrischen Nachweises von Albucid in Körperflüssigkeiten und Exkreten.

Von

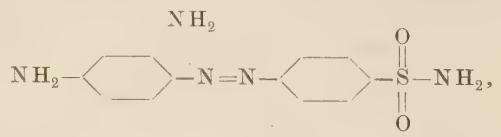
Dr. med. **Anna-Katharina Hau.**
Assistenzärztin der Klinik.

Mit 4 Textabbildungen.

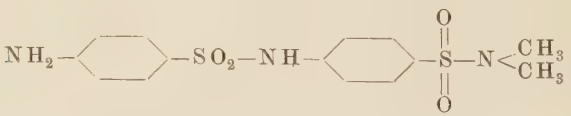
(Eingegangen am 19. Oktober 1939.)

Seit Bekanntwerden bakterizid wirkender, chemo-therapeutischer Heilmittel, die durch die Mannigfaltigkeit der Azofarbstoffe bedingt waren, verdienen nur einige wenige ein besonderes klinisches Interesse. Als bekannteste seien im Rahmen dieser Arbeit nur erwähnt das salzsaure Salz des 4-Sulfamido, 2, 4-Diaminoazobenzol (Prontosil) mit seiner spezifischen Wirkung auf alle durch Streptokokken hervorgerufenen Krankheiten und das gegen Gonorrhoe wirksame Uliron, das an der NH_2-Gruppe durch den Sulfanilsäurerest substituierte Dimethylsulfanilamid.

Prontosil:

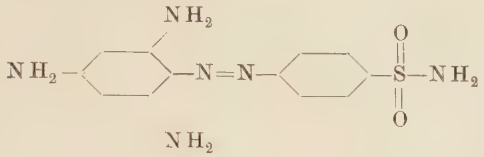


Uliron:

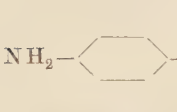


Man hat lange Zeit hindurch die für die Azofarbstoffe charakteristische N=N-Gruppe für die chemotherapeutische Wirksamkeit verantwortlich gemacht, bis durch tierexperimentelle Versuche gezeigt werden konnte, daß nur die eine Hälfte des Prontosils die bakterizide Wirkung besitzt, und zwar kommt dem bei der Reduktion entstehenden Sulfanilamid (para-Aminobenzolsulfamid) allein die streptokokkentötende Wirkung zu.

Reduktion des Prontosils:



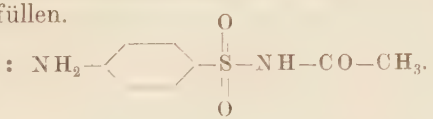
in = **1, 2, 4-Triaminobenzol**

und  = **para-Aminobenzolsulfamid.**

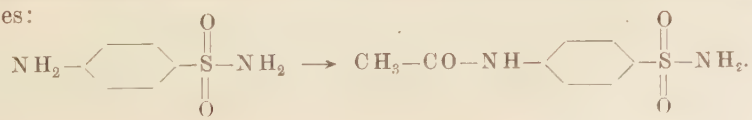
Auch der menschliche Organismus hat die Fähigkeit, die spezifische —N=N-Gruppe der Azofarbstoffe reduktiv zu spalten, so daß man die therapeutischen Eigenschaften des Prontosils auf die Sulfanilamidkomponente zurückführen kann. Ebenso konnte gezeigt werden, daß ein beträchtlicher Teil des per os oder parenteral verabreichten Mittels als Sulfanilamid im Urin erscheint.

So wurde das Sulfanilamid zum Ausgangspunkt für eine ganze Reihe neuer Verbindungen, die zum Teil Derivate des Sulfanilamids, zum Teil auch Verbindungen mit einem etwas anderen Molekülaufbau darstellen. Die wichtigste und bekannteste ist das obenerwähnte Uliron, das klinisch weitgehend geprüft und durchuntersucht worden ist, und die Erfolge, insbesondere bei der Gonorrhoe, waren bahnbrechend für die Behandlung dieser Erkrankung. Leider stellte sich bald heraus, daß eine uneingeschränkte Verwendung dieses Präparats nicht möglich war, einmal wegen seiner geringen Löslichkeit und dann wegen der mannigfachen Nebenwirkungen. Es wurde deswegen eine Verbesserung des Sulfanilsäureamids auf chemischem Wege angestrebt, und zwar derart, daß unter weitgehendster Entgiftung und bei leichter neutraler Lösungsfähigkeit eine gute Injektionsmöglichkeit und Resorption erzielt wurde, ohne dabei die Wirkung zu beeinträchtigen.

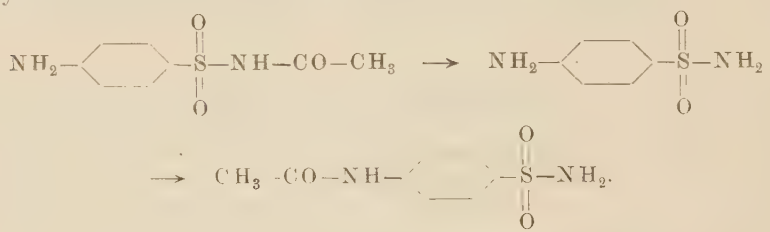
Diese Bedingungen scheint das Azetylierungsprodukt des Sulfanilamids, das 4-Aminobenzolsulfonacetamid, das unter dem Namen „Albucid" im Handel ist, zu erfüllen.

Albucid: 

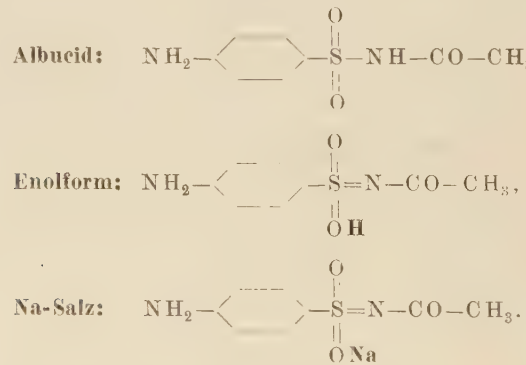
Auch der Organismus azetyliert das Sulfanilsäureamid, um es zu entgiften, zum größten Teil in der Leber an der Aminogruppe des Benzolkernes:



Diesem Azetylprodukt fehlt aber sowohl im Tierversuch wie auch in der Klinik die chemotherapeutische Wirkung. Seine Löslichkeit ist gering. Dagegen besitzt das Albucid durch die Azetylierung der $-SO_2-NH_2$-Gruppe einen ausgeprägten Säurecharakter. Es löst sich daher neutral in Alkalien und läßt sich sterilisieren, ohne daß die Azetylgruppe abgespalten wird. Es passiert als Salz einer Säure die Darmwand, zirkuliert als solches in der Blutbahn, geht auch in den Liquor über und wird durch die Nieren unverändert ausgeschieden. Etwa ein Drittel wird im Organismus verseift zum Sulfanilsäureamid, das größtenteils zur Entgiftung wiederum azetyliert wird:



Nach Vonkennel und Korth macht die basische NH_2-Gruppe des Benzolkerns die Verbindung salzsäurelöslich, und durch die Kombination der stark negativen Sulfogruppe mit der azetylierten Amidogruppe ist das Albucid vermöge seines „Iminowasserstoffatoms" eine schwache Säure, wodurch auch Alkalilöslichkeit gegeben ist. Damit ist auf Grund der physiologischen p_H-Verhältnisse die Resorption vom Magen und vom Dünndarm aus möglich. Die Löslichkeit in Alkali vollzieht sich nach Wieland über die Enolform der Sulfongruppe folgendermaßen:



Den Nachweis von Albucid in den Körpersäften haben wir nach der von Kimmig angegebenen Methode geführt, die darin besteht, daß man die NH_2-Gruppe mit salpetriger Säure umsetzt. Die resultierende Diazoverbindung kuppelt in alkalischer Lösung mit β-Naphthol, Thymol, R-Säure usw. Wir haben mit Thymol gekuppelt, wobei ein orangeroter Farbstoff entsteht, der eine quantitative Bestimmung erlaubt. Wir haben,

der Anregung durch Dozent Dr. Sturm folgend, die mit dem Autenrieth-Kolorimeter angegebene Methode auf das Pulfrichsche Stufenphotometer umgearbeitet. Durch Überführen des Albucids in den Diazofarbstoff konnten wir im Spektralphotometer feststellen, daß die höchste Absorption im Blau bei 470 $\mu\mu$, eine zweite bei 420 $\mu\mu$ liegt, die sich aber nicht mehr genau ablesen läßt (Abb. 1).

Da die Lösung in dieser Kurve zwei Absorptionsgebiete aufweist, haben wir dasjenige Spektralgebiet genommen, in dem die Absorptionskurve den höchsten Punkt erreicht. Auch bei der Messung mit allen

Abb. 1.

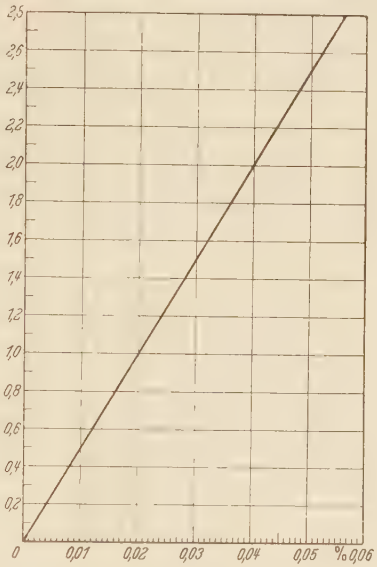


Abb. 2.

Spektralfiltern (S-Filtern) kamen wir zu dem Ergebnis, daß bei Filter S 47 (blau) das Maximum der Absorptionskurve liegt. Mit diesem Filter wurde dann durch Messungen an einer Reihe von Albucidlösungen bekannter Konzentration eine Eichkurve ermittelt, die die Abb. 2 darstellt.

An Hand dieser Kurve geben die an der vertikalen Ordinate im Stufenphotometer abgelesenen Extinktionswerte direkt die Konzentration des Albucids auf der Abszisse an, ohne daß irgendwelche Rechnungen erforderlich sind.

Zum Nachweis des Albucids sind folgende Reagenzien nötig:

1. 0,5%ige Natriumnitritlösung. (500 mg $NaNO_2$ werden in 100 ccm Aqua redest. gelöst.)
2. 0,5%ige alkalische Thymollösung. (500 mg Thymol reinst werden in 100 ccm 2 n NaOH gelöst.) Haltbarkeit begrenzt! Die Lösung muß bei Gelbwerden sofort erneuert werden. Am besten in brauner Flasche aufheben.
3. 40%ige Natronlauge. (40 g NaOH werden auf 100 ccm Aqua dest. gelöst.)
4. 20%ige Trichloressigsäure.

Nachweis von Albucid im Urin.

2 ccm Urin werden mit 2 ccm 20%iger Trichloressigsäure enteiweißt und filtriert. 1 ccm des Filtrats (= 0,5 ccm Urin) gibt man in einen 25 ccm fassenden, geeichten Meßkolben, dazu 0,2 ccm 0,5%iger $NaNO_2$-Lösung. Man kühlt in Eiswasser auf 0° ab und gibt nach 1—2 Minuten 0,2 ccm Thymollösung und 0,6 ccm der 40%igen NaOH zu und liest im Stufenphotometer ab.

Als Kompensationsflüssigkeit dient in diesem Falle eine Lösung von 1 ccm des enteiweißten Urins, die man auf 25 ccm mit Wasser auffüllt. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß der enteiweißte Urin immer noch eine Eigenfarbe zeigt, die zwar nur gering ist, aber bei dunkel gefärbten Harnen eine Absorption zeigt, die zu Fehlerquellen Veranlassung gibt, wenn man als Kompensationsflüssigkeit reines Wasser nimmt.

Der abgelesene Extinktionswert ist mit 2 zu multiplizieren. Umrechnen auf Tagesmenge.

Nachweis von Albucid im Blutserum.

4 ccm Serum werden mit 4 ccm 20%iger Trichloressigsäure enteiweißt und filtriert. 2 ccm des klaren Filtrats werden in einen 25-ccm-Meßkolben gebracht, auf 0° abgekühlt und mit 0,2 ccm 0,5%iger $NaNO_2$-Lösung versetzt. Nach 1 bis 2 Minuten gibt man 0,2 ccm Thymollösung und 0,6 ccm 40%ige NaOH zu, füllt bis zur Marke auf und liest im Stufenphotometer ab. Kompensationsflüssigkeit ist Aqua dest.

Nachweis von Albucid im Liquor.

4 ccm Liquor werden mit 4 ccm 20%iger Trichloressigsäure enteiweißt und durch ein gehärtetes Filter (Schleicher und Schüll Nr. 602 h) filtriert. 2 ccm des Filtrats werden in einen 25-ccm-Meßkolben gegeben und auf 0° abgekühlt. Dann werden 0,1 ccm 0,5%ige $NaNO_2$-Lösung zugegeben und nach 1—2 Minuten 0,1 ccm Thymollösung und 0,8 ccm der 40%igen NaOH. Man füllt bis zur Marke auf und liest im Stufenphotometer ab.

Kompensationsflüssigkeit: Aqua dest.

Nachweis von Albucid im Stuhl.

1 g Stuhl wird mit 1 ccm 10%iger NaOH versetzt, gut verrieben und dieser Brei mit 2 n HCl auf 100 ccm aufgefüllt. In diesem Filtrat wird der Nachweis geführt wie für den Nachweis im Harn.

Kompensationsflüssigkeit ist Wasser.

Der erhaltene Extinktionswert muß mit 2 und mit 100 multipliziert werden, dann erfolgt Umrechnung auf die Tagesmenge.

Wir haben nach diesen Methoden bei einer Reihe von Patienten systematisch die Ausscheidung des Albucid festgestellt und zum Teil auch kurvenmäßig festgehalten. Dabei fällt auf, daß das Albucid schon per os genommen, sehr schnell resorbiert und auch wieder ausgeschieden wird. Nach intravenöser Darreichung von 5 ccm einer 10%igen Lösung fanden wir schon eine halbe Stunde später 51 mg im Urin wieder. Bei intralumbaler Gabe bei einer akuten ascendierenden Myelitis rheumatica konnten wir nach 1 Stunde 66 mg und nach 2 Stunden 74 mg im Urin nachweisen. Der Blutspiegel steigt bei peroraler Gabe von dreimal täglich 2 Tabletten = 3,0 g in den ersten 4 Stunden auf etwa 4 mg% an, um dann wieder abzusinken. Nach 12 Stunden, also am nächsten Morgen nüchtern,

fanden wir im Durchschnitt 1,66 mg %, wobei Schwankungen von 1–3 mg % zu beobachten waren. Die kleinsten Mengen konnten wir im Liquor nachweisen, in dem wir zwischen 0,5 und 2 mg% fanden, im Durchschnitt 0,83 mg%.

Die Ausscheidung in Urin und Faeces ist fast gleich und liegt bei 3 g täglicher Einnahme bei etwa 400 mg in der Tagesmenge. Wenn Marquardt schreibt, daß durchschnittlich zwei Drittel des zugeführten Ulirons im Kot und ein Drittel im Urin nachweisbar ist, so ist damit wahrscheinlich die prozentuale Menge gemeint, und das würde dann auch mit unseren Untersuchungsbefunden sehr gut übereinstimmen.

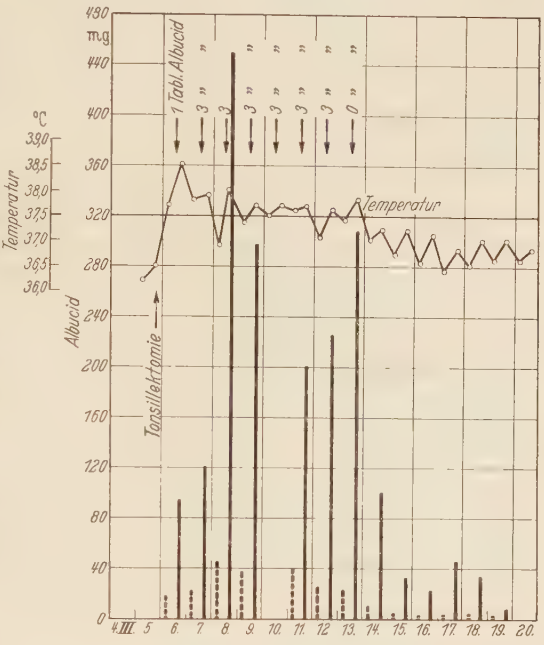


Abb. 3.

Ich halte aber die Umrechnung auf die Tagesmenge für unbedingt erforderlich, um damit die Gesamtausscheidung zu erfassen. Einen Anstieg auf hohe Werte bis vereinzelt 2000 mg% im Stuhl konnten wir niemals feststellen.

Während die Ausscheidung des Albucids in den Faeces ziemlich konstante Werte zeigt, sieht man bei der Ausscheidung im Urin doch große Schwankungen, selbst bei gleichbleibender Dosierung. Sehr deutlich zeigt das die Kurve (Abb. 3) eines 24jährigen Soldaten, der als Diphtheriebazillenträger zu uns kam und bei dem wir die Tonsillektomie durchführten. Die punktierte Linie gibt die Ausscheidung des Albucids in mg% an, die ausgezogene Linie die Tagesmenge. 6 Tage lang nach der letzten Einnahme von täglich 3 Tabletten war das Albucid noch in fallenden Mengen nachweisbar.

Zu einer ganz ähnlichen Ausscheidung kam es bei einem 25jährigen Mann, bei dem es sich auch um eine Diphtherie handelte. Da wir keine Bazillenfreiheit erreichten, ließen wir die Tonsillektomie ausführen und gaben täglich dreimal eine Tablette = 1,5 g Albucid. Nebenbei wurden Kontrollen über die Ausscheidung des Albucids im Blutserum ausgeführt, und zwar jeweils morgens nüchtern, also 12 Stunden nach Einnahme der letzten Tablette, wobei Werte von 1 und 2 mg% gefunden wurden. Die

Blutkörperchensenkungsreaktion stieg schon am Tage nach der Tonsillektomie von 3 und 10 in der ersten und zweiten Stunde auf 10 und 22 an, erreichte am 7. Tag ihren Höhepunkt mit 36 und 76, um von da an wieder zu fallen.

Eine andere Beobachtung erstreckte sich auf ein neunjähriges Mädchen mit einem Scharlach mit Nephritis. Außerdem trat noch eine Colicystitis auf, weswegen wir in den ersten 2 Tagen dreimal 2, dann laufend dreimal 1 Tablette Albucid gaben. Schon 2 Tage später war die Coliprobe negativ. Da immer noch Erythrocyten im Urin nachweisbar waren, wird die Tonsillektomie der stark vergrößerten und vereiterten Mandeln ausgeführt, in der Annahme, daß von hier aus das ganze Krankheitsbild ungünstig beeinflußt wird. Bald darauf ist auch der Urinbefund zum ersten Male negativ. Coli traten niemals wieder auf, auch die bakterielle Kontrolle ergab eine sterile Kultur.

Bei genauerem Betrachten der Kurven erkennt man allerdings doch eine gewisse Regelmäßigkeit in der Ausscheidung, und zwar fällt immer wieder auf, daß am meisten Albucid ausgeschieden wird bei und gleich nach Temperatursteigerungen. Wir konnten dies immer wieder beobachten. Es kam ganz besonders deutlich zum Ausdruck in einer Ausscheidungskurve, die wir über längere Zeit hindurch anlegten und die wir im folgenden kurz schildern: Dieser Fall betrifft eine 45jährige Frau, die mit einem sehr schweren Gesichtserysipel in der Klinik aufgenommen wurde. Wir haben nur mit Albucid und Höhensonnenbestrahlungen behandelt, und zwar gaben wir das Albucid sowohl intravenös als auch per os. Am 4. Tage schon war das Fieber zur Norm abgeklungen und die anfangs enorme Schwellung des Gesichts zurückgegangen. Nach Abklingen der Erscheinungen wurde mit Albucid abgesetzt, der Urin aber trotzdem weiter untersucht, um die Ausscheidung bis zuletzt zu kontrollieren. Am 10. Tage nach der letzten Einnahme trat plötzlich wieder eine vermehrte Ausscheidung auf, ohne daß die Patientin Albucid bekommen hätte. Bei Anfrage stellte sich dann heraus, daß bei der Patientin an demselben Tage eine Pneumonie mit fast 40° Fieber aufgetreten war. Jetzt wurde in den nächsten Tagen (allerdings neben anderer Medikation) wieder Albucid in Tabletten und auch intravenös gegeben, wobei die Ausscheidung im Verhältnis zu der anfänglichen nur sehr gering war. Ein nochmaliges Ansteigen in der Ausscheidung konnten wir wiederum feststellen nach Abklingen der Pneumonie, als am 10. Tage auch noch eine Thrombose am linken Bein auftrat. Die weitere Ausscheidungskurve zeigt keine Besonderheiten mehr. Im Blut wurden hier zu Anfang 12 Stunden nach Einnahme von 6 Tabletten 4 mg% Albucid nachgewiesen.

Die Ausscheidung des Albucids im Urin hält noch tagelang an nach Absetzen des Mittels, in einem Falle konnten wir es noch am 12. Tage nachweisen, in anderen Fällen war aber auch schon am 5. Tage nichts mehr nachweisbar. Im Durchschnitt dauerte die Ausscheidung 7,6 Tage an.

Diese Ergebnisse decken sich vollkommen mit denen von Kimmig und Vonkennel und Korth.

Diese Feststellung, daß das Albucid noch lange Zeit nachweisbar ist, ist nicht unwichtig, einmal wegen einer eventuellen Kumulation (die aber nach unseren Untersuchungen, wie noch später ausgeführt wird, nicht zu befürchten ist), und dann müssen wir nach diesen Untersuchungsergebnissen annehmen, daß der Körper imstande ist, Albucid zu speichern und bei Gelegenheit und im Bedarfsfalle wieder auszuschwemmen. Als Speicherungsorgan kommt hier wiederum, wie schon oben ausgeführt, mit größter Wahrscheinlichkeit die Leber in Frage. Wieweit auch die Milz und das retikulo-endotheliale System dabei eine Rolle spielen, müssen weitere diesbezügliche Untersuchungen ergeben.

Wie stark der Körper das Albucid speichern kann, um es dann beim nächsten Anstieg der Temperatur in außerordentlich starkem Maße plötzlich auszuschwemmen, erkennt man sehr deutlich an der Abb. 4, wo die breit ausgezogene Linie die Ausscheidung im Urin darstellt, die feine Linie die Temperaturkurve. Es handelte sich hier um einen komplikationslos verlaufenen Scharlach bei einem vierjährigen Mädel.

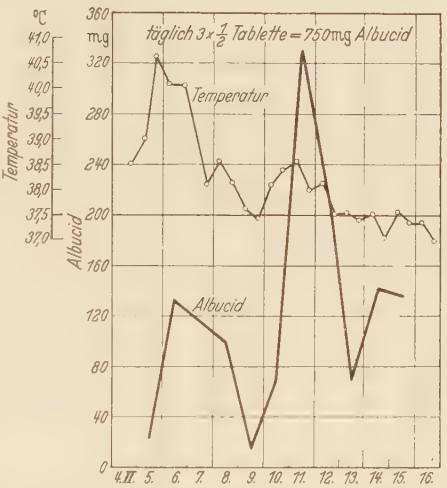


Abb. 4.

Einen ähnlichen Verlauf zeigte eine andere Kurve. Hier folgte dem einmaligen Temperaturanstieg auch nur eine einmalig erhöhte Ausscheidung von Albucid. Es handelt sich hier um einen Scharlach bei einer 40jährigen Frau. Eine mehrmalige Kontrolle des Blutspiegels ergab Werte von 1, 2 und 1 mg% Albucid.

Zu ganz anderen Ergebnissen über Konzentration und Ausscheidung kamen die Engländer, die auch ein Sulfanilsäureamidderivat klinisch erprobten, nämlich das Sulfanilsäure-Pyridylamid:

$$NH_2-\langle\quad\rangle-SO_2-NH-\langle\quad N$$

Barnett und seine Mitarbeiter konnten zeigen, daß bei Untersuchungen in Abständen von 4 Stunden die höchste Konzentration im Blute erst nach 12 Stunden erreicht war. Nach 24 Stunden war schon nichts mehr nachweisbar. Dabei fanden sie Werte zwischen 5 und 10 mg%, die höchste

Konzentration betrug sogar 15,9 mg bei einer Einnahme von 5 g pro die. Die Ausscheidung im Urin betrug zwischen 17 und 64%.

Diese außerordentlich hohen Werte, die wir und auch andere beim Albucid niemals finden konnten, sind wahrscheinlich bedingt durch die dem Präparat anhaftende schlechte Löslichkeit. Auf der anderen Seite aber erklären sie uns vielleicht das Auftreten der sehr unangenehmen Nebenwirkungen wie Cyanose, Verwirrtheitszustände, Übelkeit, Erbrechen, ja sogar in einigen Fällen Agranulocytose, während wir beim Albucid niemals derartige Nebenwirkungen auftreten sahen, wie später noch besprochen werden soll.

Daß das Albucid auch in den Liquor übergehen kann, konnten wir in einer Reihe von Untersuchungen nachweisen. Die gefundenen Werte lagen im allgemeinen unter denen des Blutspiegels zwischen 0,5 und 2 mg%. Wenn wir den Durchschnitt aller unserer Analysen im Blute und Liquor berechnen, so ergibt sich interessanterweise die Tatsache, daß im Liquor gerade die Hälfte der im Blute nachweisbaren Albucidkonzentration zu finden ist, nämlich 0,83 mg%, während der Durchschnitt im Blute sich auf 1,66 mg% berechnet. Daß aber auch umgekehrt eine außerordentlich schnelle Resorption bei i. l. Verabreichung und Ausscheidung im Urin erfolgt, wurde schon oben erwähnt, wo wir das Albucid schon 1 Stunde später im Harn nachweisen konnten. Bei i. v. Injektion von 5 ccm einer 10%igen Lösung fanden wir schon eine halbe Stunde später 51 mg im Urin wieder.

In einem anderen Falle von Meningitis gaben wir 5 ccm der 30%igen Lösung i. l. und fanden nach $2^1/_2$ Stunden 50 mg% im Urin und nach 12 Stunden 90 mg%. Am nächsten Morgen gaben wir noch 2 Tabletten per os und fanden dann nach 1 Stunde im Blute 4 mg% und im Liquor 2 mg%.

Diese außerordentlich schnelle Resorption stellten auch Vonkennel und Schmidt fest, die besonders den Übergang der Sulfonamide in den Liquor prüften, weniger wegen der praktischen Bedeutung für die Behandlung von Gehirnaffektionen als vom Standpunkt des Permeabilitätsproblems aus. Sie schreiben wörtlich: „Bei der per os verabreichten Verbindung finden wir einen schnellen Anstieg des Blutspiegels, der dem vom Prontosil album gleichkommt, und ein gleich gutes Eindringungsvermögen in den Liquor, wieder mit der typischen Tendenz der molekulargelösten Stoffe, d. h. weiterer Anstieg des Liquorspiegels bei abfallendem Blutspiegel." Sie kommen zu dem Ergebnis, daß Prontosil solubile in den Liquor übertritt. Prontosil album zeigt ein ausgezeichnetes Eindringungsvermögen. Uliron zeigt praktisch kein Permeierungsvermögen. Albucid und eine Kohlehydratverbindung des Sulfanilamids zeigen qualitativ das gleiche Verhalten wie das reine Sulfanilamid.

Zusammenfassung.

Albucid kann durch eine einfache stufenphotometrische Methode durch Überführen in eine Diazoverbindung und Kuppelung mit Thymol in allen Körpersäften nachgewiesen werden.

Albucid wird in kürzester Zeit im Körper resorbiert und wieder ausgeschieden. Die Ausscheidung dauert auch nach Absetzen des Mittels im Durchschnitt noch 7,6 Tage an.

Speicherung des Albucids geschieht wahrscheinlich und zur Hauptsache in der Leber. Bei Bedarf (z. B. bei Fieberanstieg) wird es in vermehrter Menge ausgeschieden.

Die Ausscheidung in Urin und Stuhl ist, berechnet auf die Tagesmenge, fast gleich.

Trotz Speicherung besteht nach unseren Untersuchungen keine Gefahr der Kumulation oder der Überdosierung.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Köln.
(Direktor: Prof. Dr. Jos. Schüller.)

Änderungen im Glykogengehalt des Herzens als Zeichen kumulativer Digitaliswirkung.

Von

Fritz Hahn.

(Eingegangen am 1. November 1939.)

Der heutige Standpunkt in der Kumulationsfrage ist auf die Erkenntnis gegründet, daß der Kumulationsbegriff nicht mehr in einfacher Weise auf einen substantiellen Speicherungsvorgang bezogen werden kann. Vielmehr führen wir die Kumulationserscheinungen der Digitaliskörper auf Vorgänge zurück, die sich an der biologischen Struktur der Herzmuskelzelle selbst abspielen. Wir nehmen — jedenfalls für das Tierexperiment — an, daß die einzelne Digitalisgabe das Herz in einem nachhaltig veränderten Zustand hinterläßt, der es für die nächstfolgende Digitalisgabe empfindlicher macht. Bei wiederholter Verabreichung gleicher Digitalisgaben muß daher die Wirkung von Dosis zu Dosis ansteigen, wie es ja dem Kumulationsbegriff in der phänomenologischen Bedeutung des Wortes entspricht.

Es mußte bei diesem Sachverhalt darauf ankommen, die durch die Digitalis ausgelösten Nachwirkungen auf den Zustand des Herzens eingehend zu studieren. Das ist bisher auch sowohl durch anatomische (Bauer und Fromherz[1], Büchner[2], Weese und Dieckhoff[3], Lindner[4]) wie auch durch funktionelle (Weese und Dieckhoff[3], Hahn[5]) und schließlich durch elektrokardiographische (Bauer und Reindell[6]) Untersuchungen geschehen. Es ließen sich auf diese Weise wichtige nachhaltige Veränderungen im Herzen erfassen. Veränderungen, die bei hinreichend hoher Dosierung schon nach einmaligen Gaben von Digitalis, bei kleineren Dosen erst nach wiederholten Gaben durch Summation der Einzeleffekte sichtbar werden.

Im folgenden soll nun der Versuch gemacht werden, die nachhaltigen Einflüsse der Digitalis auf den Zustand des Herzmuskels auch auf dem stoffwechselchemischen Gebiet zu erfassen.

Unmittelbarer Anlaß zu diesen Versuchen war folgender. Man hat mehrfach versucht, die Nachwirkungen der Digitaliskörper an Hand der Leistungsfähigkeit der vorbehandelten Herzen zu prüfen, Versuche, die zum

[1] Bauer, H., u. K. Fromherz: Klin. Wschr. **1933**, S. 973. — [2] Büchner, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **176**, 59 (1934). — [3] Weese, H., u. J. Dieckhoff: Ebenda, S. 274. — [4] Lindner, W.: Ebenda **192**, 163 (1939). — [5] Hahn, F.: Ebenda, S. 499. — [6] Bauer, H., u. Reindell: Ebenda **190**, 461 (1938).

ersten Male von Weese und Dieckhoff[3] in den Dienst der Kumulationsfrage gestellt worden sind. Diese Autoren gingen von dem bekannten Experiment Hatchers aus, der die Nachwirkungen einmaliger hoher Digitalisgaben über längere Zeiten hin an Hand der Verminderung der letalen Dosen bei zusätzlicher Glykosidbelastung verfolgte. Weese und Dieckhoff isolierten an Stelle der Nachtitration die Herzen im Herz-Lungenpräparat, prüften ihre Leistungsfähigkeit gegenüber Erhöhung des arteriellen Widerstandes und fanden, daß nach 0,1 mg/kg Digitoxin bei Katzen die Hubkraft des Herzens für 2–3 Tage erhöht war, während nach 0,2 mg/kg Digitoxin eine zunehmende Leistungsverschlechterung festzustellen war (kombiniert allerdings mit erhöhter Überlebensdauer des Herzens in den ersten Tagen).

Diese Befunde wurden durch eigene Versuche ergänzt, indem wir auf die kumulative Wirkung kleiner Digitalisgaben Bezug nahmen. Wir teilten zu diesem Zweck die hohen einmaligen Vordosen in wiederholt verabreichte kleine Einzeldosen auf, nachdem bereits Lendle[7] vorher den Hatcher-Versuch in entsprechender Weise abgeändert hatte. Das Ergebnis war, daß die Nachwirkungen wiederholter kleiner Gaben den Wirkungen großer Gaben entsprechen und in zwei Richtungen liegen können: an Hunden fanden wir positive, an Katzen ließen sich von uns mit Sicherheit nur die negativen Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit erfassen. Unter etwas anderen Versuchsbedingungen hatte aber Schäfer[8] schon früher an Katzen auch leistungssteigernde Nachwirkungen kleiner Digitalisgaben festgestellt.

Die Leistungsabnahme steht selbstverständlich in engster Beziehung zu den Vorgängen, die zu dem anatomisch nachweisbaren Gewebsuntergang führen und findet in diesen ihre Erklärung. Unklar ist aber die Bedeutung der nachhaltigen positiv-inotropen Digitaliswirkung, wenn man nicht, wie Weese und Dieckhoff es tun, die Ursache in einer Glykosidspeicherung erblickt. Man wird aber bei dem heutigen Stand der Dinge auch nach anderen Erklärungsmöglichkeiten suchen müssen. Es käme dann darauf an, festzustellen, ob nicht auch für die Leistungssteigerung besondere Nachwirkungen der Digitaliskörper auf den Herzzustand als verantwortliche Faktoren in Betracht kommen könnten.

Bei dieser Sachlage tauchte die Frage auf, ob nicht die Änderung der Leistungsfähigkeit in der einen wie in der anderen Richtung mit Verschiebungen im Gehalt des Herzens an jenen Stoffen, die als Energiequellen in Frage kommen, einhergehen. Um einen Einblick zu gewinnen, haben wir aus der Zahl der in Betracht kommenden Stoffe das Glykogen herausgegriffen. Wir waren uns dabei zwar bewußt, daß wir gerade über die physiologische Bedeutung des Herzglykogens noch wenig wissen. Anderer-

[7] Lendle, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **180**, 518 (1936). — [8] Schäfer, H.: Ebenda **174**, 286 (1934).

seits lagen aber bereits gewisse Beobachtungen vor, die auf Digitaliseinflüsse in dieser Richtung deuten und die wir weiter ausbauen zu müssen glaubten. D'Alessandria [9] fand im digitalisierten Kaninchenherzen eine Mehreinlagerung von Glykogen — allerdings nur auf Grund histochemischer Methoden. Lasch und Triger [10] berichten über Erhöhung des Gesamtzuckers in Herz und Leber von Meerschweinchen, die 6 Tage lang täglich 0,017 mg Strophanthin erhalten hatten. Abgesehen davon, daß die dabei erhaltenen Ausschläge nur sehr gering erscheinen, waren die Versuche in der vorliegenden Form noch nicht ausreichend, um in Parallele zu den Leistungsprüfungen gesetzt zu werden.

In Anlehnung an diese mußten vielmehr Versuche in der Weise durchgeführt werden, daß zunächst die Wirkung einmaliger höherer Digitalisgaben auf den Glykogengehalt geprüft wurde mit besonderer Berücksichtigung des zeitlichen Ablaufs der Veränderungen. Hieran mußten sich dann Versuche anschließen mit wiederholten kleinen Gaben.

Da Katzen für diese Versuche aus äußeren Gründen nicht in Frage kamen, Nagetiere wenig geeignet erschienen, wählten wir als Versuchstier die für Digitalisversuche schon vielfach bewährte Taube.

Experimentelles.

Wie für die zitierten Leistungsversuche wurde Digitoxin „Merck" benutzt. Die tödliche Dosis des Präparats lag bei 0,4 mg/kg Taube bei intramuskulärer Injektion.

Die Glykogenbestimmung erfolgt nach Simonovits [11]. Die Tauben wurden durch Dekapitieren getötet. Sofort danach wurde mit größtmöglicher Geschwindigkeit das Herz durch einen mit der Knochenschere geführten Schnitt durch Brustmuskel und Sternum freigelegt. Dann wurde die Herzspitze rasch mit einer Pinzette gefaßt und durch einen Querschnitt, der etwa durch die Mitte der Herzkammermuskulatur ging, abgetrennt. Zur Kontrollbestimmung wurde dann noch der Rest der Kammer unterhalb der Kammer-Vorhofscheidewand abgetrennt. In späteren Versuchen wurde auf diese Kontrolle, die immer ausreichend übereinstimmende Werte ergab, verzichtet, da wir den Kammerrest für andere Versuche benötigten. Die Herzteile wurden sofort in Kalilauge gebracht, gewogen und weiterverarbeitet. Wir haben davon Abstand genommen, die Herzteile in flüssige Luft zu bringen, wie es neuerdings Schumann [12] vorgeschlagen hat.

In allen Versuchen wurde auch das Leberglykogen untersucht, einerseits um etwaige Digitaliseinflüsse auf die Leber damit zu erfassen, andererseits zur Kontrolle des Ernährungszustandes der Tiere.

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der Untersuchungen war die Kenntnis der Abhängigkeit des Herzglykogens von den Fütterungs-

[9] D'Alessandria, E.: Fol. med. (It.) **18**, 1399 (1932). — [10] Lasch, F., u. K. Triger: Z. exper. Med. **88**, 588 (1933). — [11] Simonovits, S.: Biochem. Z. **265**, 437 (1933). — [12] Schumann, H.: Z. exper. Med. **105**, 14 (1939); ferner Grunke, Schumann u. Böhm: Ebenda **103**, 117 (1938).

bedingungen. Diese Abhängigkeit besteht darin, daß der Glykogengehalt im Herzen bei längerem Fasten ansteigt (Evans[13], Schumann[12]). Da der Einfluß des Fastens somit in der gleichen Richtung lag wie der zu erwartende Digitaliseffekt auf das Glykogen, schien es angebracht, stets ausreichend gefütterte Tiere in den Versuch zu nehmen. Wir waren uns dabei bewußt, daß (wie Schumann angibt) 48 Stunden fastende Tiere eine geringere Streuungsbreite der Glykogenwerte aufweisen als frisch gefütterte (nach Versuchen an Ratten).

Auf dieser Grundlage bauten wir zunächst die Normalversuche auf als Vergleichsbasis für die später zu besprechenden Digitalisversuche (Tabelle 1).

Wir legten hierbei in erster Linie Wert auf Tauben, die vor 24 Stunden zum letzten Male gefüttert waren, weil diese Bedingung der Mehrzahl der Digitalisversuche entspricht. Der Durchschnittswert beträgt 0,30% in 7 Versuchen. Zusätzlich fanden wir dann noch in 4 Versuchen an frisch gefütterten Tieren einen hiervon nicht wesentlich abweichenden Wert (0,35%). Auch nach längerem Fasten führten wir einige orientierende Versuche aus, wobei nach 48 Stunden in 2 Versuchen noch keine als sicher erhöht anzusprechenden Werte ermittelt wurden, wohl aber nach 72 Stunden (im Mittel aus drei Versuchen 0,54%).

Das Leberglykogen zeigt ein der Ernährungslage entsprechendes Verhalten und ist nach 48stündigem Fasten bereits auf kleine Reste abgesunken.

Die Digitalisversuche mit einmaligen Dosen ergeben sich aus Tabelle 2. Um zunächst die Beziehungen zwischen Dosis und Wirkung festzustellen, gaben wir 0,2 mg kg Digitoxin i. m., entsprechend 50% der letalen Dosis, und steigerten dann die Dosis in späteren Versuchen bis auf 0,3 mg/kg (75% der letalen Dosis). Nach 24 Stunden erfolgte die Glykogenbestimmung (Spalte d der Tabelle 2). Den Tauben wurde nach der Injektion das Futter fortgenommen. Nur in einigen Fällen ließen wir es zur Beobachtung der Freßlust stehen. Da die Tiere aber die Nahrung verweigerten, können diese Versuche gemeinsam mit den anderen besprochen werden. Sinngemäß sind sie mit den Normalversuchen der Spalte b in Tabelle 1 zu vergleichen.

Aus unseren Befunden läßt sich nun in der Tat ein deutlicher Einfluß des Digitoxins auf das Herzglykogen ableiten. Die Wirkung besteht in einer 24 Stunden nach der Injektion nachweisbaren Erhöhung des Glykogengehalts. Diese Glykogenverschiebung ist aber an sehr hohe Digitoxinkonzentrationen gebunden. Während nach 0,2 mg/kg noch kein Effekt auftritt, ist er nach 0,25 mg schon angedeutet, erreicht aber erst nach 0,3 mg die größte Ausprägung in unseren Versuchen. Der normale Glykogenbestand ist hierbei um etwa 100% überschritten (0,62%).

[13] Evans, G.: J. Physiol. (Brit.) **82**, 468 (1934).

Tabelle 1. Glykogengehalt im Herzen und in der Leber normaler Tauben.

a) Gefütterte Tiere				b) Nach 24 Std. Fasten				c) Nach 48 Std. Fasten				d) Nach 72 Std. Fasten			
	Herz				Herz				Herz				Herz		
Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%
13	0,43	0,40	5,48	1	0,30	0,34	1,28	25	0,36	0,33	0,05	58	0,71	—	0,13
14	0,20	0,21	2,00	3	0,20	0,17	0,82	26	0,34	0,31	Spuren	59	0,42	—	0,16
18	0,37	0,34	4,00	4	0,41	0,42	0,67					60	0,49	—	0,15
34	0,41	—	2,06	32	0,29	—	0,96								
				33	0,36	—	2,42								
				37	0,20	—	1,00								
				39	0,36	—	0,30								
Mittel:	0,35				0,30				—				0,54		

Tabelle 2. Glykogengehalt im Herzen und in der Leber von Tauben nach einmaliger Vorbehandlung mit Digitoxin.

Dosis	a) Nach 3 Std.				b) Nach 6 Std.				c) Nach 17 Std.				d) Nach 24 Std.				e) Nach 48 Std.				f) Nach 72 Std.			
		Herz				Herz				Herz				Herz				Herz				Herz		
mg/kg	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%	Nr.	Spitze g%	Basis g%	Leber g%
0,2													2	0,32	0,34	0,74								
													5	0,38	0,40	0,70								
													6	0,33	0,28	0,21								
													49	0,23	—	1,19								
Mittel:														0,32										
0,25													22	0,55	0,53	1,90								
													23	0,45	0,45	2,50								
													24	0,49	0,49	0,16								
Mittel:														0,50										
0,3	35	0,42	—	1,90	11	0,51	0,53	3,54	7	0,63	0,64	3,35	9	0,80	0,71	3,34	17	0,41	0,44	0,49	21	0,45	—	0,11
	36	0,18		0,62	12	0,20	0,20	3,12	8	0,67	0,63	4,30	10	0,75	0,71	4,53	19	0,79	0,72	1,20	46	0,40	—	5,51
					15	0,44	0,44	2,14	31	0,45		1,26	27	0,44		1,10	20	0,70	0,63	0,97	47	0,42		0,08
					16	0,36	0,36	2,45					28	0,45		3,98					48	0,21	—	0,03
													29	0,83		1,40								
													30	0,60		2,54								
													38	0,65		2,04								
													40	0,41		0,94								

Von Interesse ist auch das Verhalten der Leber. Es fällt auf, daß die Leberwerte trotz des 24stündigen Fastens im großen und ganzen etwas höher liegen als bei den Normalversuchen unter den gleichen Bedingungen. Wie nicht anders zu erwarten, ist allerdings die Streuung der Leberwerte besonders groß. Aber immerhin wird man auf Grund unserer Versuche auch einen Einfluß des Digitoxins auf das Leberglykogen annehmen können.

Die anderen Spalten der Tabelle berichten über den zeitlichen Ablauf der geschilderten Veränderungen, und zwar nur für 0,3 mg Digitoxin, die wirksamste Dosis unserer Versuche. 3 Stunden nach Verabreichung des Giftes (hier intravenös gegeben) liegen die Glykogenwerte im Bereich der normalen; allerdings sind hier nur 2 Versuche ausgeführt worden. Aber auch nach 6 Stunden ist in 4 Versuchen ebenfalls ein nennenswerter Effekt nicht vorhanden. Nach 17 Stunden aber ist die volle Wirkung nachweisbar. Diese hält sich nun noch nach 48 Stunden auf der gleichen Höhe und ist erst 72 Stunden nach Beginn der Vergiftung nahezu abgeklungen.

Bemerkt sei, daß die nach 3 Stunden untersuchten Tiere vor der Digitoxinapplikation 20 Stunden ohne Fressen waren, worauf die niedrigen Leberwerte beruhen. In den anderen Versuchen waren die Tiere frisch gefüttert. In den Versuchen, die sich über 24 Stunden erstreckten, wurde den Tieren auch nach der Injektion das Futter belassen. Aber sie fraßen meist nicht, wie der Leberglykogenbestand beweist, der nach 72 Stunden sehr abgesunken ist (mit einer Ausnahme). Trotz des Fastens sinkt also das Herzglykogen am 3. Tage wieder ab. Dadurch erhält die Glykogenverschiebung zu diesem Zeitpunkt eine gegensätzliche Richtung im Vergleich zu Normaltieren nach 3tägigem Fasten.

Zusammenfassend finden wir also eine Glykogenvermehrung, die sich sowohl durch einen recht erheblichen Grad der Veränderung sowie durch eine beträchtliche Nachhaltigkeit auszeichnet. Charakteristisch ist ferner, daß dieser Zustand erst geraume Zeit nach der Berührung des Herzens mit dem Glykosid seine volle Ausprägung erlangt. Auch auf das Leberglykogen scheint sich dieser Digitaliseinfluß zu erstrecken.

Die Wirkung ist bei einmaliger Giftverabreichung an sehr hohe Dosen gebunden, die über 50% der letalen Dosis liegen müssen. Sie ist also der Ausdruck einer schweren Vergiftungsreaktion des Herzens. Dementsprechend zeigten die Tiere auch die Zeichen einer Allgemeinschädigung. Die Freßlust hörte auf, die Tiere waren apathisch und saßen mit gesträubten Federn teilnahmslos im Käfig.

In den folgenden Versuchen haben wir dann die Digitoxindosis von 0,3 mg/kg in mehrere kleinere Einzeldosen aufgeteilt, die in Abständen von 24 Stunden gegeben wurden. 24 Stunden nach der letzten Injektion erfolgte die Glykogenbestimmung. Wir gaben dreimal 0,1 und sechsmal 0,05 mg kg. Futter wurde während der ganzen Dauer der Versuche ausreichend vorgesetzt.

Wieder ist der Glykogengehalt auf mindestens den doppelten Betrag der normalen Werte im Mittel erhöht (Tabelle 3). Dieses Ergebnis ist

insofern von Interesse, als die Einzeldosen weit unterhalb der Grenze derjenigen Dosen liegen, die bei einmaliger Zufuhr noch einen meßbaren Ausschlag ergeben. Es handelt sich hier also um einen echten kumulativen Effekt. Besonders fällt noch auf, daß auch quantitativ betrachtet die Wirkung nicht der Wirkung einmaliger großer Gaben bei gleicher Gesamtdosierung nachsteht — trotz der Intervalle der Einzelgaben.

Tabelle 3. Glykogengehalt im Herzen und in der Leber von Tauben nach wiederholter Vorbehandlung mit Digitoxin.

Nach 6 mal 0,05 mg/kg Digitoxin				Nach 3 mal 0,1 mg/kg Digitoxin			
Nr.	Herz		Leber	Nr.	Herz		Leber
	Spitze g%	Basis g%	g%		Spitze g%	Basis g%	g%
41	0,73	—	1,66	52	0,48	—	0,80
42	0,97	—	2,32	53	0,72	—	3,00
43	0,71	—	3,11	50	0,80	—	3,35
44	0,38	—	1,43	51	0,72	—	4,24
54	0,47	—	0,75				
55	0,51	—	0,92				
56	0,47	—	2,41				
57	0,61	—	0,34				
Mittel:	0,61				0,68		

Ein Einfluß auf das Leberglykogen läßt sich am ehesten in dem Versuch mit dreimaligen Gaben von 0,1 mg nachweisen. Denn die Tauben fraßen in den letzten 24 Stunden vor der Injektion nicht mehr. Trotzdem liegen die Werte recht hoch. In der anderen Versuchsserie (6 mal 0,05) liegt das Leberglykogen niedriger. Auch diese Tiere fraßen in den letzten 24 Stunden nicht mehr. An den vorangehenden Tagen war die Freßlust noch vorhanden, aber schon am 4.—5. Tag eingeschränkt. Da wir den Einfluß dieser Tatsachen nicht sicher abschätzen können, wollen wir aus dieser Versuchsserie keine Schlüsse auf etwaige Einwirkungen des Digitoxins auf das Leberglykogen ableiten.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Versuche bestätigen die Erwartung, daß sich auch auf stoffwechselchemischem Gebiet nachhaltige Zustandsänderungen des Herzens nach vorausgehender Digitalisbehandlung erfassen lassen. Die Veränderung, um die es sich hier handelt, besteht in einer Glykogenvermehrung. Wir bestätigen damit ähnliche Angaben von D'Alessandria[9] sowie Lasch und Triger[10], haben sie aber in uns wesentlich erscheinender Hinsicht erweitert.

So möchten wir vor allem darauf hinweisen, daß die geschilderten Vorgänge die Folge einer „toxischen" Digitaliswirkung sind. D. h. bei einmaliger Giftdarreichung sind es nur sehr hohe Gaben, die eine Wirkung auslösen. Bei kleineren Gaben tritt die Wirkung erst auf, wenn durch mehrfache Wiederholung der Einzeldosen eine stärkere Digitalisvergiftung erzeugt

wird. Auf Grund dieses Ergebnisses ist es von Interesse, daß Freund [14] auf Grund von Stoffwechselversuchen mit Herzmuskelbrei bei „toxischen" Digitaliskonzentrationen eine Abnahme in der Verwertung von Glucose und Glykogen fand, während er „therapeutischen" Konzentrationen eine entgegengesetzte Wirkung zuschreibt. Bisher war nicht klar ersichtlich, ob diese Angaben Freunds mit den Befunden von Lasch und Triger sowie D'Alessandria übereinstimmten, da diese Autoren ihre Befunde offenbar mit der „therapeutischen" Digitaliswirkung in Zusammenhang brachten.

Mit diesen Feststellungen leiten aber unsere Befunde zum Kumulationsproblem über. Wir können die Kumulation als die Erscheinung definieren, daß bei wiederholter Anwendung von Digitalis in bestimmten Zeitintervallen allmählich Wirkungen auftreten, die die Wirkungspotenz der Einzelgabe weit übersteigen. Das würde aber nichts anderes bedeuten, als daß sich alle Äußerungen der kumulativen Digitalisvergiftung identifizieren lassen mit den Wirkungen einmaliger entsprechend hoher Gaben, eine Auffassung, die auch durch zahlreiche Erhebungen weitgehend gestützt erscheint (Lendle[7], Lü Fu Hua[15], Lindner[4], Hahn[5]). In unserem speziellen Falle könnten wir aus dieser Überlegung den Schluß ableiten, daß die Glykogenvermehrung, die wir zunächst als Ausdruck der Vergiftung des Herzens mit einer hohen Digitoxindosis kennengelernt haben, auch als Kennzeichen einer kumulativen Vergiftung durch wiederholte Zufuhr kleiner Gaben auftreten könnte. Wir haben nun in der Tat zeigen können, daß kleinere Digitoxindosen, die für sich noch keine Wirkung auf den Glykogengehalt des Herzens ausüben, durch mehrfache Wiederholung der gleichen Dosen in Abständen von 24 Stunden diese Wirkung erlangen.

Damit würde die Glykogenvermehrung im Rahmen der Kumulationsfrage eine ähnliche Rolle spielen wie die bisher bekannten Zustandsänderungen des Herzens durch einmalige hohe oder wiederholte kleinere Digitalisgaben, von denen wir als wichtigstes Grundphänomen die Erhöhung der Digitalisempfindlichkeit hier herausgreifen wollen. Wir wollen prüfen, ob sich beide Vorgänge tatsächlich in Parallele setzen lassen. Leider liegen Messungen der Nachwirkung von Digitalis auf die Glykosidempfindlichkeit für Tauben nicht vor. Aber wir dürfen trotzdem in einem Punkte eine Übereinstimmung zwischen Glykogenvermehrung und Veränderung der Glykosidempfindlichkeit erwarten auf Grund der Erfahrungen an anderen Tierarten: nämlich darin, daß meßbare und länger anhaltende Veränderungen der Glykosidempfindlichkeit bei einmaligen Digitalisdosen erst auftreten, wenn sehr hohe Dosen angewandt werden. Was nun die Dauerhaftigkeit dieser Wirkung betrifft, so kann diese freilich je nach der Tierart sehr verschieden sein, d. h. sich über Stunden (Kaninchen), Tage (Hund) oder Wochen (Katze) (Hatcher[16]) erstrecken. Doch scheidet die

[14] Freund, H.: Verh. dtsch. pharmak. Ges. **1932**, S. 73. — [15] Lü Fu Hua: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **180**, 539 (1936). — [16] Hatcher, R. A.: Arch. int. Med. (Am.) **10**, 268 (1912).

Katze als vergleichbares Tier sicher aus, da hier besondere Bedingungen gelten, gekennzeichnet durch das Auftreten von Nekrosen und dadurch bedingten Spättod. Für Tauben dürften diese Vorgänge nicht in Betracht zu ziehen sein, da sich die Taube nach Digitoxindosen, die nicht in relativ kurzer Zeit zum Tode führen, bald wieder erholt. Da aber bei anderen Tierarten die Nachwirkung einer einzigen, selbst sehr hohen Digitoxindosis auf die Glykosidempfindlichkeit höchstens wenige Tage anhält, ähnlich also wie die Glykogenvermehrung, erscheint letztere von ausreichender Dauerhaftigkeit, um als Begleiterscheinung der erhöhten Digitalisempfindlichkeit aufgefaßt werden zu können.

Wir müssen uns freilich mit der Feststellung dieser rein äußerlichen Analogien begnügen. Denn einen Kausalzusammenhang zwischen Glykogengehalt und erhöhter Ansprechbarkeit für Glykoside läßt sich wohl kaum annehmen. Es dürfte sich hier wohl nur um koordinierte Erscheinungen handeln, die aber vielleicht doch letzten Endes auf eine gleiche Stoffwechselwirkung der Digitalis ursächlich zurückgehen. Doch müssen diese Fragen offenbleiben. Jedenfalls aber glauben wir zusammenfassend sagen zu dürfen, daß mit der Beeinflussung des Glykogenstoffwechsels durch Digitoxin eine weitere wichtige Erfahrung über Nachwirkungen der Digitaliskörper gewonnen ist, die auch für das Kumulationsproblem irgendeine Bedeutung haben wird.

Wie eingangs erwähnt, gehören zu den Nachwirkungen der Digitaliskörper u. a. auch charakteristische Veränderungen der Herzleistung. Sie liegen je nach der Dosierung in entgegengesetzter Richtung: Leistungssteigerung nach kleineren und Leistungsschädigung nach größeren Dosen. Besondere Schwierigkeit bereitet die Deutung der Leistungssteigerung. Auf Grund unserer Befunde liegt aber immerhin der Gedanke nahe, diesen Effekt mit der Glykogenvermehrung in einen ursächlichen Zusammenhang zu bringen. Ob das aber wirklich zutrifft, ist auf der Grundlage der bisherigen Befunde kaum sicher zu entscheiden, da die Glykogenversuche an Tauben, die Leistungsversuche an Katzen und Hunden ausgeführt worden sind. Es müßte also erst experimentell geprüft werden, ob die leistungsfähiger gefundenen vorbehandelten Katzen- und Hundeherzen auch glykogenreicher als normale Herzen waren.

Will man trotzdem schon jetzt die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenhangs zwischen Glykogenvermehrung und Leistungssteigerung diskutieren, so wird man vielleicht dem Einwand begegnen, daß wir die Glykogenvermehrung als eine „toxische" Digitaliswirkung bezeichnet haben. Wir meinten damit die Tatsache, daß die Wirkung auf das Glykogen an hohe Dosen gebunden ist und um so stärker in Erscheinung tritt, je höher die Dosen sind. Man wird von hohen Dosen auf die Herzkraft eher einen schädigenden Einfluß erwarten. Tatsächlich ist dies aber erst nach extrem hohen Dosen nachweisbar der Fall (z. B. 0,15—0,2 mg/kg Digitoxin bei der Katze). Andererseits liegen auch die Dosen, die in den Versuchen von Weese

und Dieckhoff eine nachhaltige Leistungssteigerung machten, schon recht hoch, wenn auch niedriger als die nachhaltig schädigenden Dosen. Sie betragen 0,1 mg/kg, was bei der Katze mindestens 50% der zeitlos letalen Dosis ausmacht. Es wäre also denkbar, daß diese Dosen auch ausreichend hoch sind, um bei der wesentlich digitalisempfindlicheren Katze das Herzglykogen schon zu vermehren, ohne schädlich für die Herzleistung zu sein. Innerhalb eines solchen Dosierungsbereiches könnte sich dann die Glykogenvermehrung günstig auf die Herzleistung auswirken. Das gleiche könnte auch bei wiederholter Zufuhr kleinerer Dosen durch Kumulation zustande kommen, wenn die Kumulation nicht zu weit getrieben wird. Wir sind uns bewußt, hierbei nur einen der Faktoren erfaßt zu haben, die auf dem großen Gebiet des Muskelstoffwechsels in Betracht zu ziehen wären.

Die weitere Analyse hätte dann auch aufzuklären, ob vielleicht auch die Leistungsschädigung mit der hier untersuchten Stoffwechselwirkung der Digitalis in einem Zuammenhang steht. Es wäre immerhin möglich, daß Leistungssteigerung und -schädigung Folgen eines einheitlichen Stoffwechselvorganges wären, indem die günstige Auswirkung vielleicht an die erste Phase dieses Vorgangs gebunden zu denken wäre, die ungünstige Auswirkung aber die Folge einer fortschreitenden Intensivierung dieses mutmaßlichen Prozesses wäre.

Eine kurze Erörterung bedarf zum Schluß die Frage, welche Bedeutung unseren Untersuchungen für die Digitalistherapie zukommt. Da die Glykogenvermehrung in enger Beziehung zur Kumulation steht, ist die Frage identisch mit der Frage, ob es am Krankenbett die Kumulationserscheinungen des Tierexperiments gibt. Bekanntlich findet aber diese Annahme von seiten namhafter Kliniker, vor allem von Edens[17], Ablehnung. Diese Ablehnung betrifft die Kumulation als toxisches, d. h. unerwünschtes Phänomen. Könnte aber die Glykogenvermehrung als Zeichen eben beginnender Kumulation als erwünschter Vorgang bei der Digitalistherapie in Betracht kommen? D'Alessandria[9] glaubt in der Tat mit seinen Befunden einen wichtigen Vorgang bei der Digitalistherapie aufgedeckt zu haben, indem er vor allem die Nachhaltigkeit der therapeutischen Digitaliswirkung damit in Zusammenhang bringt. Nach unserer Auffassung, gestützt durch die Einblicke, die die eigenen Versuche in die Bedingungen dieser Glykogenvermehrung gewährt haben, sprechen die niedrigen Dosen bei der praktischen Digitalistherapie nicht sehr für einen solchen Zusammenhang. Man wird vielmehr Edens folgen, der die Nachhaltigkeit der therapeutischen Wirkung auf indirekte Digitaliswirkungen bezieht, d. h. auf Erholung des Herzens durch verbesserte Coronardurchblutung als Folge der systolischen Wirkung. Immerhin könnte aber bei lange fortgesetzter Digitalistherapie, besonders mit bestimmten, zur Kumulation neigenden Präparaten, der hier unter-

[17] Edens, E.: Klin. Wschr. **1936**, S. 1829; Münch. med. Wschr. **1938**, S. 1415.

suchte Mechanismus auch am kranken Herzen wirksam werden. Ob und in welcher Weise bliebe noch zu untersuchen.

Eine ganz andere Frage ist es, wie etwa primär vorhandene Störungen des Glykogenhaushaltes insuffizienter Herzen durch Digitalis beeinflußt werden. Diese Frage aber geht über den Rahmen dieser Untersuchungen hinaus.

Zusammenfassung.

1. Digitoxin in einmaligen Dosen von über 50% der letalen Dosis steigert bei Tauben den Glykogengehalt des Herzens. Die Vermehrung beträgt bei einer Dosis von 75% der letalen Dosis etwa 100%. Dieser Effekt beginnt erst nach 6 Stunden in Erscheinung zu treten, bleibt zwei Tage auf voller Höhe und klingt erst am dritten Tag wieder ab.

2. Teilt man die einmalige Dosis in 3 oder 6 Teildosen auf, die in Abständen von je 24 Stunden verabreicht werden, so ist am Tage nach der letzten Injektion etwa die gleiche Vermehrung des Glykogens nachweisbar wie 24 Stunden nach der einmalig verabreichten Gesamtdosis.

3. Auch auf das Leberglykogen scheint ein gleichsinniger Einfluß des Digitoxins zu bestehen.

4. Hinsichtlich der Dosierungsbedingungen wie auch hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs der Glykogenverschiebung im Herzen bestehen Ähnlichkeiten mit den bereits bekannten Nachwirkungen der Digitaliskörper (Veränderung der Glykosidempfindlichkeit usw.) und es könnte daher, genau so wie es für diese gilt, auch die Nachwirkung auf den Glykogengehalt als ein Kennzeichen der kumulativen Vergiftung aufgefaßt werden.

5. Es wird erörtert, inwieweit die Glykogenvermehrung die Ursache der nach bestimmten Digitalisdosen nachgewiesenen nachhaltigen Leistungssteigerung sein könnte, ohne daß man für letztere eine Glykosidspeicherung als Ursache anzunehmen brauchte.

Nachtrag. Zu einem tieferen Verständnis der geschilderten Vorgänge gelangt man vielleicht, wenn man versucht, die spezielle Digitaliswirkung auf das Herzglykogen in Zusammenhang zu bringen mit unseren Vorstellungen über das Wesen der Digitaliswirkung im allgemeinen. Danach besteht die Digitalis-„Urwirkung" in einer Sensibilisierung des Herzmuskels für den Vagus. Nun sind in der Tat zwischen dem Glykogengehalt der Organe und dem vegetativen Nervensystem bzw. den vegetativen Giften Beziehungen bekannt, die es erlauben, auch die Glykogenvermehrung im Herzen als Folge einer gesteigerten Vaguswirkung aufzufassen.

Nun hat in neuester Zeit Kull[18] einen interessanten Beitrag zur Frage der Beziehungen zwischen Digitalis und Vagussystem geliefert, indem er feststellte, daß tödliche Glykosiddosen im Froschherzen eine Vermehrung des aus dem Herzen mit Trichloressigsäure extrahierbaren Azetylcholins hervorrufen, ein Befund, der bisher an Warmblütern (Katze) — vielleicht aus methodischen Gründen — nicht reproduziert werden konnte.

Im Hinblick auf unsere Befunde schien es immerhin möglich, daß die Glykogenvermehrung von einer entsprechenden Vermehrung des Azetylcholins begleitet sein

[18] Kull: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 447 (1939).

könnte. Wir haben daher in einer Reihe von Versuchen den Azetylcholingehalt im Vorhof und in der Kammer des Taubenherzens 3 und 24 Stunden nach Verabreichung von 0,3 mg/kg Digitoxin untersucht. Eine Erhöhung im Vergleich zu normalen Tauben war dabei aber nicht mit Sicherheit nachzuweisen, wenngleich nach 24 Stunden eine geringe, aber nicht beweiskräftige Vermehrung vorhanden zu sein schien. Da wir die Versuche aber aus äußeren Gründen abbrechen mußten, muß die Mitteilung der Ergebnisse vorbehalten bleiben, bis wir die Frage weiter haben klären können. Vor allem sind noch nicht genügend Versuche mit eserinisierten Tauben ausgeführt worden.

Eine Klärung dieser Frage scheint uns um so wichtiger, als es bisher noch schwer erscheint, die Befunde von Kull zu deuten. Wir wissen noch zu wenig darüber, welche physiologische Bedeutung das aus allen Organen in relativ großen Mengen extrahierbare Azetylcholin besitzt. Da die Mengen ein Vielfaches der pharmakologisch maximal wirksamen Dosen betragen, muß man annehmen, daß dieses Azetylcholin in irgendeiner Weise an der unmittelbaren Ausübung seiner bekannten pharmakologischen Wirkungen verhindert ist. Das durch Vagusreizung in Freiheit gesetzte oder neugebildete Azetylcholin macht sicher nur einen Bruchteil derjenigen Azetylcholinmenge aus, die aus dem Herzen mit Säure extrahiert werden kann. Es ist denn auch in der Tat gefunden worden, daß nach Vagusreizung eine Vermehrung des Azetylcholins im Herzextrakt nicht faßbar ist und auch nicht faßbar sein kann, weil die Vermehrung prozentual zu gering ist (Beznák[19], Vartiainen[20]). Wenn aber nach Kull das Azetylcholin im Herzextrakt bei Digitalisvergiftung um mehrere 100% ansteigen kann, so erscheint das immerhin im Hinblick auf die Versuche mit Vagusreizung als ein eigentümlicher und noch nicht völlig zu deutender Befund.

Schwierigkeiten bereitet auch der negative Befund bei Warmblütern. Wenn Kull dies darauf zurückführt, daß er bei Katzen kein Eserin anwandte (im Gegensatz zu den Froschversuchen), so wäre es doch immerhin von Interesse gewesen, zu erfahren, ob die Versuche auch an Fröschen ohne Eserin negativ ausgefallen wären. Ganz sicher erscheint dies meines Erachtens nicht. Denn es ist nicht erwiesen, daß das in die Extrakte übertretende Azetylcholin in dem Zustande, in dem es in den Zellen vorkommt, für die Esterase angreifbar ist. Beznák hat nämlich gefunden, daß sich aus Organen, die nach der Herausnahme aus dem Körper einige Zeit lagern, unveränderte Mengen von Azetylcholin gewinnen lassen. Er hat sogar Tatsachen mitgeteilt, die dafür sprechen, daß das mit Trichloressigsäure extrahierbare Azetylcholin im Herzen gar nicht in freier Form vorhanden ist, sondern als solches erst durch die Behandlung der Organe mit Säure entsteht.

---

[19] Beznák, A. B. C.: J. Physiol. (Brit.) **82**, 129 (1934). — [20] Vartiainen, A.: Ebenda, S. 282.

Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.
(Leiter: Prof. Dr. Hinsberg.)

Die Bedeutung der Verbindung Hypophyse — Zwischenhirn für die Melanophorenhormonausschüttung durch Porphyrin.

Von

W. Rodewald.

(Eingegangen am 31. Oktober 1939.)

Wir haben bereits berichtet, daß Hämo- und Protoporphyrin eine Ausschüttung von Melanophorenhormon aus der Hypophyse bewirken (1). Um festzustellen, ob das Porphyrin direkt auf die Hypophyse wirkt oder ob für diese Reaktion die nervöse Reizung von Zwischenhirnzentren aus von Bedeutung ist, wurde bei Fröschen vor der Porphyrininjektion der Hypophysenstiel durchtrennt. Es ist bekannt, daß die Hypophyse vom Zwischenhirn wesentliche Impulse für die Hormonproduktion und Abgabe empfängt, wie dies in Versuchen von Herold und Effkemann (2), Westman (3) u. a. beschrieben worden ist.

Die nachstehenden Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt: Den Fröschen, Rana temporaria, wurde in Äthernarkose das Munddach über der Hypophyse keilförmig eröffnet und das abgelöste Knochenstück zurückgeklappt. Darauf wurde in der ersten Versuchsreihe der Hypophysenstiel nur durchschnitten, in der zweiten zwischen Hypophyse und Zwischenhirn noch ein dünnes Glimmerplättchen eingefügt. War bei dieser Operation die Hypophyse verletzt worden, was sich in einer rasch eintretenden Verdunkelung des Frosches zeigt, so ist das Tier für den Versuch nicht zu verwenden. Nach der Operation verdunkeln allerdings alle Tiere schwach, eine Reaktion, die man in stärkerem Ausmaß bei geblendeten Fröschen beobachten kann. Die Durchschneidung der nervösen Verbindungen zwischen Hypophyse und Zwischenhirn führt wahrscheinlich zu einer Reizung, die diese Hormonsekretion zur Folge hat. Die Frösche, die nach der Operation bald aus der Narkose aufwachen, ähneln in ihrem Verhalten zunächst normalen Fröschen; nach einigen Tagen treten bei allen Ödeme auf, die mit einer starken Wasserretention zusammenhängen, an der die Tiere allmählich eingehen.

Am Tage nach der Operation wurde den Fröschen einmal 2 mg Protoporphyrin in den dorsalen Lymphraum injiziert, was bei unbehandelten Tieren meistens in 2 Stunden eine deutliche, sich bis zu 48 Stunden verstärkende Verdunkelung bewirkt. Bei den hier zum Versuch verwandten Fröschen, denen der Hypophysenstiel durchtrennt war, ließ sich etwa

30—40 Minuten nach der Injektion eine enorme Aufhellung beobachten, die fast 10—15 Stunden anhielt. Die Tiere erscheinen dann fast weiß. Nach 24 Stunden geht diese Aufhellung deutlich zurück. Nach etwa 30 Stunden hat sich dann wieder die ursprüngliche Anfangsfärbung eingestellt. Bei 5 von den 9 Versuchstieren wurde nach 50 Stunden eine enorme Verdunkelung des ganzen Tieres beobachtet. Krämpfe, wie sie nach der durch gleich große Porphyrindosen hervorgerufenen Verdunkelung beim intakten Frosch auftreten, kamen nicht vor.

Ob diese späte Verdunkelungsreaktion noch direkt auf die vorhergehende Porphyrininjektion zurückgeführt werden kann, hat sich bisher nicht feststellen lassen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei aber vielmehr um eine reaktive Verdunkelung auf die vorher beobachtete starke Aufhellung hin. Diese Aufhellung ist offenbar durch eine direkte Beeinflussung der Nebennieren durch das Porphyrin ausgelöst worden. Es konnte bereits früher beobachtet werden, daß bei hypophysektomierten Fröschen ebenfalls nach Porphyrin ein starkes Erblassen eintritt, das auf eine Sekretion des für die Aufhellung der Frösche verantwortlichen Adrenalins zurückgeführt wurde.

In beiden Versuchsreihen, also bei den Fröschen, bei denen nur der Hypophysenstiel durchtrennt war, wie bei denen, wo noch ein Glimmerplättchen eingeschoben war, wurde der gleiche Reaktionsablauf beobachtet.

Die kurze Zeit nach der Porphyrininjektion auftretende Verdunkelung beim Frosch ist also von der intakten Verbindung Hypophyse—Zwischenhirn abhängig, so daß primär eine Reizung der Zwischenhirnzentren durch das Porphyrin bewirkt werden muß, von wo aus die Impulse zur Melanophorenhormonsekretion gegeben werden. Ist die Reizleitung zur Hypophyse unterbrochen oder aber die Hypophyse herausgenommen worden, dann blassen die Frösche nach Porphyrin stark ab, was wahrscheinlich mit einer Anregung der Adrenalinsekretion zusammenhängt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit, die auf eine Anregung von Herrn Prof. Hinsberg zurückgeht.

Literatur.

1) Hinsberg, K., u. W. Rodewald: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 1—11 (1938). — 2) Herold u. Effkemann: Klin. Wschr. **1939**, I, S. 455—456. 3) Westman: Verh. internat. Kongr. Geburtsh. **2**, 487—490 (1938).

Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.
(Leiter: Prof. Dr. Hinsberg.)

Über die oestrogene Wirkung von Porphyrinen.

Von

W. Rodewald.

(Eingegangen am 31. Oktober 1939.)

Nachdem festgestellt werden konnte, daß Porphyrine eine Ausschüttung von Melanophorenhormon (1) und gonadotropem Hormon (2) aus der Hypophyse bewirken können, wurden weitere Arbeiten in Angriff genommen, in denen die Wirkung von Porphyrin auf das übrige inkretorische System untersucht werden sollte. Dabei stellte es sich heraus, daß durch Porphyrininjektionen bei der kastrierten Maus Oestrus hervorgerufen werden kann. Diese interessante Tatsache erscheint einer gesonderten Veröffentlichung wert.

Die Versuche wurden an albinotischen Mäusen durchgeführt, die mindestens 5 Wochen vor Versuchsbeginn kastriert worden waren und bei denen vom 10. Tag nach der Operation an täglich der Scheidenabstrich kontrolliert worden war. Die Tiere waren vorher nicht mit Follikulin geprüft worden. Die erste Serie, 12 Tiere, erhielten an vier aufeinanderfolgenden Tagen je 0,8 mg Hämatoporphyrin Nordmark subcutan, dann wurde 1 Tag ausgesetzt und an den folgenden 4 Tagen noch einmal je 0,8 mg injiziert. Eins von diesen Tieren starb am 5. Versuchstag, bei einem anderen traten keine Veränderungen im Abstrich ein, während sich bei allen anderen am 5. oder 6. Tag nach Versuchsbeginn reines Schollenstadium zeigte, das 2—4 Tage anhielt. An den nächsten 2—4 Tagen waren wieder vorwiegend Leukocyten im Abstrich, denen dann wieder ein zweitägiges Schollenstadium folgte. Nach einer Pause von 2 Tagen, in denen wieder nur vorwiegend Leukocyten gefunden wurden, ließ sich bei den zuerst am stärksten reagierenden Tieren noch ein 3. Epithelien oder Oestrusstadium nachweisen. In den folgenden 10 Tagen trat keine Reaktion mehr ein.

Dasselbe ließ sich bei 4 von 8 mit der gleichen Dosis Protoporphyrin behandelten Tieren feststellen, bei denen ebenfalls das Oestrusstadium dreimal wiederholt auftrat.

Auffallend ist, daß, trotzdem die Injektionen während oder kurz nach dem ersten Oestrus abgesetzt wurden, die Tiere noch zweimal mit einer Unterbrechung von einigen Tagen wieder reagieren. Soweit ich die Literatur übersehen konnte, ist das bisher noch bei keiner der bekannten oestrogenen Substanzen beobachtet worden.

In einer zweiten Reihe, in der 5 Tiere am 1., 3., 5., 7. und 10. Versuchstag je 0,2 mg Hämatoporphyrin erhielten, sprachen nur 2 Tiere mit Schollen-

stadium an: der erste Oestrus am 5. Tag nach Versuchsbeginn, dann 12 Tage Leukocyten, wieder 3 Tage Schollen, 3 Tage Leukocyten, 3 Tage Schollen, 5 Tage Leukocyten und wieder 3 Tage Schollen.

In der dritten Versuchsreihe — 8 Tiere — wurde innerhalb von 3 Tagen in 6 Injektionen im ganzen $^5/_{100}\,\gamma$ Hämatoporphyrin gegeben. Bei drei von diesen Tieren trat nach 28 Tagen, bei einem nach 36 Tagen Oestrus ein. Da diese Tiere 2 Monate vor Versuchsbeginn kastriert worden waren und vorher nie Schollen im Abstrich hatten, die auch bei den anderen unbehandelten Tieren nie beobachtet worden waren, muß man annehmen, daß diese späte Reaktion auf die Porphyrininjektionen zurückgeführt werden kann. Allerdings ist zu beachten, daß hier eine sehr lange Latenzzeit vorliegt. Was die kleinen Porphyrinmengen anbetrifft, so wurde auch beim Frosch bei der Melanophorenhormonausschüttung und bei der infantilen Maus in bezug auf die Ausschüttung von gonadotropem Hormon mit noch kleineren Mengen eine Reaktion gefunden.

In weiteren Versuchen mit einmaliger Injektion von 0,7, 0,4 mg und $^5/_{100}\,\gamma$ wurde keine Reaktion gefunden.

Zahlenmäßige Angaben über die Porphyrinwirkung bei der kastrierten Maus lassen sich aus diesen kurzen Versuchsreihen noch nicht geben, da die Tiere auch vorher nicht auf ihre Reaktionsfähigkeit geprüft worden waren. Es hat sich jedoch in den vorstehenden Versuchen eindeutig zeigen lassen, daß durch Hämato- und Protoporphyrin bei der kastrierten weiblichen Maus Oestrus hervorgerufen werden kann. Bei stärkeren Dosierungen wurde nach Absetzen der Injektion wiederholt Oestrus beobachtet. Das könnte dafür sprechen, daß nicht das Porphyrin selbst oestrogene Wirkungen entfaltet, sondern daß erst eine körpereigene oestrogene Substanz wirksam gemacht wird, die dann noch einige Zeit weiter rhythmisch sezerniert wird.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeiten, die auf eine Anregung von Herrn Prof. Hinsberg zurückgehen.

Literatur.

1) Hinsberg u. Rodewald: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 1—11 (1938); — 2) Rodewald: erscheint demnächst.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Versuche über chemische Zellreizung an Fibroblastenkulturen*.

I. Mitteilung: Uabain.

Von

Wolfgang Heubner und Emma Schreiber.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. Oktober 1939.)

Auf dem Gebiete der Änderung formativer Lebensäußerungen durch chemische Substanzen begegnen sich die fachlichen Interessen von Pathologen und Pharmakologen. Insonderheit sind mit der Frage einer „Stimulation" der Lebenserscheinungen auch außerhalb der nervös, muskulär oder drüsig differenzierten Gewebselemente viele grundsätzlich wichtige Erscheinungen der theoretischen Medizin verknüpft. Für sie gilt κατ' ἐξοχήν, was Schmiedeberg vor 56 Jahren über die Grenzen von Pathologie und Pharmakologie schrieb: „Es handelt sich bei dieser Einteilung wie bei verwandten Wissenszweigen überhaupt im Grunde nur um eine Arbeitsteilung. Für das Endresultat ist es gleichgültig, ob schließlich die Pathologie in die Pharmakologie aufgeht oder umgekehrt, und ob dann beide mit der Physiologie zu einer einheitlichen Lebenslehre zusammenfließen."

Die „Arbeitsteilung" ist in einem halben Jahrhundert weiter fortgeschritten, wie jeder täglich erkennt, bedauert, aber doch immer wieder von neuem zu überwinden trachtet. Wenn einer zu denen zu rechnen ist, die sich bei vollendeter Sachkenntnis im einzelnen weiten Blick und umfassendes Urteil bewahrt haben, so ist es Max Borst. In diesen Eigenschaften liegt auch die Nachsicht begründet, an die sich die hier folgenden Mitteilungen wenden müssen, wenn sie – dürftig genug in ihren Ergebnissen – ihm doch ernstliche Bemühungen und insofern eine geistige Verbundenheit, vor allem aber die Verehrung für den erfolggekrönten Siebzigjährigen dartun wollen.

I.

An Kulturen von Hühnerfibroblasten und -leukocyten unter den meist gebräuchlichen, d. h. optimalen Milieubedingungen hatte G. Orzechowski[1] einen das Wachstum oder die Auswanderung vergrößernden

* Diese und die beiden folgenden Arbeiten sind Herrn Geheimrat Prof. Max Borst in München zum 70. Geburtstage gewidmet. — Die Kosten dieser Arbeiten wurden aus einer dankenswerten Beihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft bestritten.

[1] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **178**, 229 (1935).

Einfluß bei Applikation kleiner Dosen körperfremder „gewebsreizender" Stoffe vermißt. Die Bedingungen waren 36° C, Hühnerplasma mit dem doppelten Volumen 10%igen Embryonalextraktes, zweitägige Periode für die Wachstumsmessung. Die geprüften Stoffe wurden unter denjenigen ausgewählt, die erfahrungsgemäß am lebenden Mischgewebe des Säugetieres „entzündliche" Veränderungen hervorrufen, nämlich K-Strophanthin („Kombetin"), Uabain (Gratus-Strophanthin), Cantharidin, Campher und Menthol. Am ausgiebigsten wurde Uabain untersucht. In 5 Versuchsreihen mit 47 Einzelversuchen wurden Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-7} Uabain in der Weise geprüft, daß jeweils eine halbe Kultur ohne Zusatz, die Schwesterhälfte mit Uabainzusatz bebrütet wurde. Für jedes Paar wurde der Zuwachs in der zweitägigen Periode als Quotient (mit der Wachstumsgröße des unbehandelten Stückes als Nenner) ausgedrückt; für diesen Quotienten (den „Wachstumsindex") fand sich in den 5 Reihen der mittlere Wert von 1,03 ($\pm$ 0,124), was bedeutet, daß der Giftzusatz keinerlei erkennbaren Einfluß auf das Wachstum ausgeübt hatte.

In 8 weiteren Versuchsreihen[1] mit insgesamt 217 Einzelversuchen wurde die Auswanderungsgeschwindigkeit von Leukocyten auf gleichen Nährböden, wie sie zur Züchtung von Fibroblasten dienten, gemessen. Auch hier wurden Kulturpaare verwendet und der Quotient aus behandelter und unbehandelter Kultur berechnet. Die Uabainkonzentrationen waren wieder 10^{-9} bis 10^{-7}. Der Quotient („Wanderungsindex") betrug im Mittel der 8 Versuchsreihen 0,84 ($\pm$ 0,21), sprach also ganz gewiß nicht für eine Beschleunigung der Auswanderung.

Dies eindeutig negative Ergebnis von Orzechowski schien der weiteren Prüfung wert, um so mehr, als von anderen Forschern wiederholt behauptet wurde, daß durch kleine Dosen zellschädigender Substanzen regelmäßig gesteigerte Neubildung von Zellen in der Kultur hervorzurufen sei. Es wiederholt sich anscheinend mit der neuen Technik dasselbe, was jahrzehntelang bei Bakterien beschrieben wurde, daß nämlich „Desinfektionsmittel" in kleinen Dosen, d. h. unterhalb der entwicklungshemmenden Schwelle, die Entwicklung der Organismen unter sonst gleichen Bedingungen begünstigten[2]. Auch hier waren jedoch die Ansichten der Forscher geteilt und auch hier gibt es solche, die viele derartigen Beobachtungen als Irrtümer, sei es wegen ungeeigneter Versuchsanordnung, sei es wegen fehlgreifender Versuchsdeutung, ansehen[3].

Desinfektionsmittel können nun im allgemeinen zur Gruppe der „gewebsreizenden, entzündungserregenden" Substanzen gerechnet werden. Dies gilt auch insbesondere für die wirksamsten Schwermetalle, wie Quecksilber und Kupfer[4]. Mit solchen haben in den letzten Jahren mehrere Untersucher aus dem Pharmakologischen Institut von Yoshizumi Ozaki in Kyoto (Japan) Wachstums-

[2] Vgl. z. B. Hueppe: Naturwissenschaftl. Einführung in die Bakteriologie, S. 55. Wiesbaden 1896. — [3] Vgl. z. B. Süpfle: Münch. med. Wschr. **1922**, S. 920; Cobet u. van der Reis: Biochem. Z. **129**, 73; **133**, 49 (1922). — [4] Vgl. z. B. Leber, Th.: Entstehung der Entzündung. Leipzig 1891.

steigerung an Gewebskulturen beschrieben. Außer Quecksilberchlorid [5, 6, 7], Hydrargyrum bibromatum, Hydrargyrum cyanatum, Hydrargyrum oxycyanatum [5], Kupfersulfat [8], Bleiacetat [9] erwiesen sich jedoch im gleichen Sinne als wirksam auch Nickel- und Kobaltchlorür, Mangansulfat, Alaun, Kaliumchromat, Natriumwolframat [10], sowie Quecksilber, Kupfer, Gold, Silber, Platin, Wismut, Zinn, Eisen und Selen in metallischer (zum Teil wohl partiell oxydierter), fein verteilter Form [11]. Auch organische Quecksilberverbindungen, wie Novasurol, Salyrgan, Neptal zeigten das gleiche [12], ferner Metalloide und ihre Verbindungen, wie gelber Phosphor (in Emulsion mit Gummi arabicum) [13], Borsäure und Borax [14], arsenige und Arsensäure mit ihren Salzen [15], kakodylsaures Natrium, Atoxyl [16, 17], Neosalvarsan, Myosalvarsan, Saviolnatrium [17], Brechweinstein [18]. Ferner wurden dieselben Ergebnisse erzielt bei der Anwendung von Äthylalkohol [19], aliphatischen Methyl- und Äthylaminen (als Hydrochloride) [20], von arcmatischen Aminen [21], ferner Cholin, Azetylcholin und Betainhydrochlorid [22], Pilocarpin, Physostigmin, Arecolin [23], Strychnin [24], d-Glykose, d-Galaktose, d-Fruktose, d-Mannose [25], Vigantol, Vogan, Vitamin A, Metabolin, Laktoflavin und l-Ascorbinsäure [26], Santonin und santoninsaurem Natrium [27], Sinomenin, Parasinomenin [28], kristallinischem Follikelhormon, Ovarhormonbenzoat, Pelamin, Oophorminum luteum [29], Antuitrin, Hypophysin, Insulin, Thyroxin, Thyreoglandol, Testiglandol, Ovoglandol und Luteoglandol [30], Testosteron, Methyltestosteron, Methyldihydrotestosteron, Dehydroandrosteron, Androsten-dion, Androstendiol, Synhormon und Enarmon [31]. Diese zahlreichen organischen Substanzen wird man kaum als „gewebsreizend" bezeichnen können. Zweifelhaft könnte man in dieser Hinsicht sein bei Histamin [31], während man eine gewebsreizende Wirkung unbedingt zuerkennen wird den Glykosiden der Digitalisgruppe, von denen ebenfalls mit dem gleichen oben genannten Erfolge geprüft wurden: Digitoxin, Digitalin, Digitalein, Pangital, Digifolin, Digalen [32], Convallamarin, Helleborein, Adonidin, *k*- und g-Strophanthin [33].

Ohne Wirkung in Richtung einer Wachstumsförderung blieben in den Arbeiten der genannten Schule die folgenden Substanzen: Bolus alba, Talkum, Tierkohle, Ruß [34], Cocain, Tropacocain, Novocain, Alypin und Tutocain [35], Atropin, l-Hyoscyamin, Scopolamin, Homatropin, Eumydrin [36], Chinin, Chinidin, Cinchonin, Cinchonidin, Optochin [37], Morphin, Narkotin, Papaverin, Narcein, Thebain [38, 39], Codein, Dionin, Eukodal, Heroin [40, 41], Peronin, Eukodal, Dicodid [42], Phenol, Kresol,

[5] Hirashima: Fol. pharmacol. jap. **19**, Breviaria 76 (1934). — [6] Hirashima: Ebenda **20**, Br. 52 (1935). — [7] Saito: Ebenda **21**, Br. 50 (1935). — [8] Yamada: Ebenda **22**, Br. 71 (1936). — [9] Hirashima: Ebenda **19**, Br. 84 (1935). — [10] Nakazawa: Ebenda **21**, Br. 24 (1935). — [11] Nitta: Ebenda **21**, Br. 62 (1936). — [12] Hirashima: Ebenda **19**, Br. 77 (1934). — [13] Saito: Ebenda **21**,Br. 49 (1935). — [14] Maeda: Ebenda **21**, Br. 52 (1935). — [15] Sanjô: Ebenda **19**, Br. 70 (1934). — [16] Okada: Ebenda **18**, Br. 148 (1934). — [17] Sanjô: Ebenda **19**, Br. 71 (1934). — [18] Okada: Ebenda **19**, Br. 74 (1934). — [19] Mizugaki: Ebenda **23**, Br. 15 (1936). — [20] Funayama: Ebenda **24**, Br. 65 (1937). — [21] Funayama: Ebenda **24**, Br. 47 (1937). — [22] Funayama: Ebenda **24**, Br. 48 (1937). [23] Kawashima: Ebenda **15**, Br. 8 (1932). — [24] Saito: Ebenda **21**, Br. 50 (1935). [25] Huang: Ebenda **18**, Br. 143 (1934). — [26] Nitta: Ebenda **24**, Br. 64 (1937). — [27] Nitta: Ebenda **24**, Br. 66 (1937). — [28] Sanjô: Ebenda **15**, Br. 10 (1932). — [29] Kubo: Ebenda **25**, Br. 37 (1938). — [30] Maeda: Ebenda **23**, Br. 24 (1937). — [31] Kubo: Ebenda **26**, Br. 17 (1938). — [32] Manabe: Ebenda **13**, Br. 6 (1931); Sanjô: Ebenda **15**, Br. 14 (1933). — [33] Manabe: Ebenda **14**, Br. 4 (1932); Sanjô: Ebenda **15**, Br. 15 (1933). — [34] Nitta: Ebenda **22**, Br. 49 (1936). — [35] Saito: Ebenda **21**, Br. 21 (1934). — [36] Kawashima: Ebenda **13**, Br. 27 (1931). — [37] Sanjô: Ebenda **13**, Br. 29 (1931). — [38] Sanjô: Ebenda **14**, Br. 5 (1932). — [39] Semura: Ebenda **16**, Br. 5 (1933). — [40] Sanjô: Ebenda **14**, Br. 9 (1932). — [41] Mizugaki: Ebenda **25**, Br. 32 (1938). — [42] Semura: Ebenda **16**, Br. 6 (1933).

Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol[43], Pituitrin[44], Methyl-, Äthyl-, Normalpropyl- und Isopropylalkohol[45], Normalbutyl-, Sekundärbutyl- und Isobutylalkohol[46], Amylenhydrat, Urethan, Hedonal, Paraldehyd, Neuronal, Bromural, Chloralhydrat, Bromalhydrat, Chloralamid, Sulfonal, Trional, Veronal, Luminal[47], Chlor-, Brom-, Jodnatrium[48], l-Arabinose, l-Xylose[49], Maltose, Saccharose, Glykogen[50], Natriumnitrat, -nitrit, -chlorat, -bromat, -jodat, -sulfat, -thiosulfat, -phosphat[51], Emetin, Cephaelin[52], Sesam-, Erdnuß-, Rizinus- und Leinöl, Terpentin-, Wacholder-, Sandel- und Copaivabalsamöl[53]. Hier würde man das Terpentin- und Wacholderöl zu den „gewebsreizenden" Substanzen rechnen müssen.

Besondere Aufmerksamkeit haben wir der Arbeit von Tomonori Manabe[33] geschenkt, weil darin die auch von Orzechowski untersuchten Glykoside K-Strophanthin und Uabain (g-Strophanthin) studiert wurden. Die Arbeit erschien vor derjenigen von Orzechowski, war diesem jedoch nicht bekanntgeworden. Soviel wir — auch unter Berücksichtigung des japanischen Textes* — erkennen können, hat Manabe grundsätzlich die gleiche Methode gebraucht wie Orzechowski, nämlich ebenfalls Tochterkulturen derselben Mutter-Reinkultur ohne und mit Zusatz des Giftes 2 Tage wachsen lassen und den Zuwachs gemessen. Allerdings konnte er, wie auch einige andere der japanischen Forscher aus der genannten Schule, mit wesentlich größeren Mutterkulturen arbeiten als wir, daher neben der Kontrolle stets mehrere weitere Tochterkulturen gewinnen, deren jede eine verschiedene Konzentration des Giftes erhielt. Außerdem arbeitete Manabe mit Deckglaskulturen, Orzechowski mit Flaschenkulturen. Wir geben die Befunde von Manabe wieder, wobei wir allerdings ein wenig anders rechnen als er. Wenn uns die japanischen Ausdrücke richtig übersetzt wurden, nahm er — wie alle seine japanischen Kollegen — den Quotienten aus Endareal und Anfangsareal als Aus-

Tabelle 1 (nach Manabe).

Die Ziffern I bis X entsprechen verschiedenen Mutterkulturen; die in den senkrechten Reihen verzeichneten Werte stammen von Schwesterkulturen.

Gift	Dosis	Relatives Wachstum						Wachstumsindex					
		I	II	III	IV	V	Mittel	I	II	III	IV	V	Mittel
K-Strophanthin	0	6,0	7,3	7,4	6,1	7,6	6,9 ± 0,35	—	—	—	—	—	—
	$8 \cdot 10^{-8}$	8,2	8,0	9,5	10,6	11,4	9,5 ± 1,48	1,37	1,10	1,28	1,74	1,50	1,40
	$4 \cdot 10^{-7}$	9,1	8,2	8,7	8,5	7,3	8,4	1,52	1,12	1,29	1,39	0,96	1,26
	$2 \cdot 10^{-6}$	4,9	6,9	7,4	6,2	6,9	6,5	0,82	0,96	1,00	1,02	0,91	0,94
	$1 \cdot 10^{-5}$	4,1	8,1	4,1	3,2	4,3	4,8	0,68	1,11	0,55	0,52	0,57	0,69
		VI	VII	VIII	IX	X	Mittel	VI	VII	VIII	IX	X	Mittel
Uabain	0	7,0	7,2	6,1	6,0	7,0	6,7 ± 0,56	—	—	—	—	—	—
	$8 \cdot 10^{-8}$	9,0	8,9	11,9	8,9	10,2	9,9 ± 1,57	1,29	1,24	1,95	1,48	1,46	1,48
	$4 \cdot 10^{-7}$	8,3	7,1	8,6	8,3	9,3	8,3	1,19	0,99	1,41	1,38	1,33	1,26
	$2 \cdot 10^{-6}$	7,2	6,9	5,8	7,1	6,0	6,6	1,03	0,96	0,95	1,18	0,86	1,00
	$1 \cdot 10^{-5}$	5,8	6,4	4,5	4,4	4,8	5,2	0,83	0,89	0,74	0,73	0,69	0,78

[43] Maeda: Fol. pharmacol. jap. **21**, Breviaria 60 (1936). — [44] Maeda: Ebenda **23**, Br. 24 (1937). — [45] Kirihara: Ebenda **14**, Br. 15 (1932). — [46] Kirihara: Ebenda **14**, Br. 16 (1932). — [47] Kirihara: Ebenda **13**, Br. 5, 7, 12, 13 (1931). — [48] Hirashima: Ebenda **17**, Br. 13 (1934). — [49] Huang: Ebenda **18**, Br. 48 (1934). — [50] Huang: Ebenda **18**, Br. 144 (1934). — [51] Hirashima: Ebenda **18**, Br. 146 (1934). — [52] Sanjô: Ebenda **15**, Br. 10 (1932). — [53] Saito: Ebenda **23**, Br. 1 (1936).

* Fräulein Johanna Herzfeld haben wir für freundliche Übersetzungshilfe sehr zu danken.

gangswert, während wir den Quotienten aus der Differenz vom Endareal und Anfangsareal und dem Anfangsareal bilden. (Sehr viel kommt auf diese Differenz der Berechnung übrigens noch an.) Von zwei solchen Quotienten, die man „relatives Wachstum" zu nennen pflegt, bilden wir einen weiteren Quotienten als „Wachstumsindex", in dem jedesmal die Zahl für die unbehandelte Kultur der gleichen Mutterkultur im Nenner steht, für eine behandelte Schwesterkultur im Zähler.

Die angewandten Dosen haben wir nicht ganz eindeutig ermitteln können: Aus der Schilderung des methodischen Vorgehens in den genannten japanischen Serienarbeiten [54] ist zu ersehen, daß stets 4 Teile Plasma mit 1 Teil Nährsalzlösung (als Kontrolle) oder Giftlösung gemischt wurde, von dieser Mischung je ein Tropfen mit einem Tropfen Embryonalextrakt zusammengebracht wurde. Die ursprünglich hergestellte Giftlösung wurde also bei Ansetzen der Kulturen etwa zehnmal verdünnt. Wir sind nicht sicher, ob sich die Konzentrationsangaben von Manabe auf die Konzentration der Giftlösung oder auf die zehnmal geringere in dem fertigen Kulturmedium beziehen; im ersteren Falle müßten die angegebenen Zahlen der Tabelle 1 jeweils um eine Zehnerpotenz erniedrigt werden.

Die Frage ist von Interesse für den Vergleich mit Orzechowskis Angaben. Er fand — in Flaschenkulturen — bereits bei der Konzentration von 10^{-6} meist eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums (also einen „Index" weit unter 1), während Manabe noch bei $2 \cdot 10^{-6}$ ein normales Wachstum feststellte, selbst wenn er auf 3 weitere Passagen der behandelten Kultur fortgesetzt die gleiche Konzentration einwirken ließ. Natürlich können solche Unterschiede der Empfindlichkeit vorkommen, aber vielleicht liegen die wirklich angewandten Konzentrationen doch weiter auseinander als es nach den angegebenen Zahlen scheint. Wichtiger ist der Unterschied bei den geringeren Konzentrationen, die bei Manabe 25- und 125mal niedriger liegen als die bereits deutlich schädliche Konzentration (10^{-5}). Bei diesen sah Manabe in der überwiegenden Zahl seiner Versuche eine erhebliche (über 1,25 liegende) Erhöhung des Wachstumsindexes durch beide Strophanthinarten (vgl. Tabelle 1). Wenn er auch für jede Einzeldosis nur 5 Kulturen verwendete, erscheinen seine Zahlen doch überzeugend. Bei der Konzentration $8 \cdot 10^{-8}$ (in Wahrheit vermutlich bei nahezu 10^{-8}) lag für beide Glykoside in sämtlichen Versuchen die Größe des Zuwachses oberhalb des höchsten Wertes in den unbehandelten Kulturen. Die Befunde werden überdies dadurch erhärtet, daß von sämtlichen Kulturen nach Messung des zweitägigen Zuwachses erneut Tochterkulturen und dann noch zwei weitere Passagen unter den gleichen Bedingungen weitergezüchtet wurden und dabei die Unterschiede der Wachstumsintensität im gleichen Verhältnis erhalten blieben. Die Zahlenwerte dieser drei weiteren Reihen von Vergleichsmessungen sind hier nicht wiedergegeben.

Demgegenüber sah Orzechowski bei der 10- und der 100fachen Verdünnung derjenigen Dosis, die den Wachstumsindex auf 0,5—0,6 herabdrückte ($1 \cdot 10^{-6}$), — also auch bei 10^{-8} — keinerlei Abweichung, die systematisch gewesen wäre, und als höchste Abweichung eines Mittelwertes für den Wachstumsindex nur 20% von der Einheit (gegenüber 26 bis 48 bei Manabe). Hier liegt also ein deutlicher Unterschied der beidersei igen Befunde vor, der recht schwer zu deuten ist.

Bemerkenswert scheint uns, daß die Streuung bei den japanischen Forschern, also auch bei Manabe, sehr viel geringer war als wir jemals beobachten konnten: sie betrug in den vier hier besprochenen Versuchsreihen 10—13%, dagegen bei Orzechowski 10—44%, im Mittel 28% (in allen Fällen wurde als „Streuung" die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert der Wachstumsindizes in Prozenten dieses Mittelwertes berechnet).

[54] Vgl. Fol. pharmacol. jap. **13**, Breviaria 6: Manabe; Ebenda, Br. 29: Sanjô; Ebenda **17**, Br. 13 (1932): Hirashima; Ebenda **18**, Br. 148: Okada (1934).

Vielleicht verdient es Erwähnung, daß die Japaner mit Deckglaskulturen gearbeitet haben, Orzechowski dagegen Flaschenkulturen wählte. Auch wir haben gelegentlich an Deckglaskulturen bei Zusatz kleiner Mengen Gift so überwiegend vermehrtes Wachstum gesehen, daß wir einen reellen Stimulationseffekt vor uns zu haben glaubten. Solche Beobachtungen waren jedoch nicht regelmäßig reproduzierbar und in Flaschenkulturen sehr selten. Deshalb glauben wir nicht, sie tatsächlich als Wirkungen des Giftes ansehen zu dürfen.

An Deckglaskulturen fanden Druckrey und Schreiber[55] im Coffein ein Mittel, dessen kurzfristige Anwendung in relativ geringen Dosen an der Gewebskultur von Fibroblasten einen offensichtlich reellen, d. h. jede natürliche Variationsbreite weit übertreffenden fördernden Einfluß auf das Wachstum ausübte. Dies ist aus drei Gründen besonders interessant: Erstens zeigen die Versuche, daß methodisch die Fibroblastenkulturen auch in unserer Hand grundsätzlich geeignet sind, Stimulationsreize für das Wachstum erkennen zu lassen. Zweitens wirkt Coffein in höheren Dosen anscheinend ziemlich elektiv auf die Teilungsvorgänge von Zellen, wie aus den Befunden von Stieve[56] über seinen Einfluß auf die Keimdrüsen, von Chase[57], sowie Smith und Hambourger[58] auf das Wachstum von Hühnern und Ratten wohl schon vermutet werden konnte, wie es aber durch Druckrey[59] an Seeigeleiern klar erwiesen wurde: z. B. blieben die Blastulae in Coffeinlösung am Leben und beweglich, ohne sich jedoch weiter zu entwickeln, solange Coffein gegenwärtig war; hier offenbart sich also eine elektive Wirkung des Coffeins auf diejenigen Anteile der Gesamtfunktionen, die der Vervielfältigung der Zelle dienen. Drittens aber darf wohl gesagt werden, daß Coffein keineswegs zu den eigentlich „entzündungserregenden" Giften gehört, vielmehr im lebenden Mischgewebe des Warmblüters meist reaktionslos ertragen wird.

Bei dieser Sachlage bleibt zu überlegen, ob die bei entzündlichen Vorgängen oder „Reizzuständen" auftretenden Zellvermehrungen (und sonstigen Anzeichen gesteigerter Zellaktivität) eine unmittelbare Folge des einwirkenden Reizmittels sind. Mechanische oder thermische „Reizung" führt ja zu „Entzündung" erst bei tatsächlicher „Schädigung", selbst „Zerstörung" gewisser Gewebsbestandteile, und für alle „ätzenden", z. B. auch die meisten „desinfizierenden" Stoffe dürfte das gleiche gelten. Für die eigentlich „entzündungserregenden" Stoffe erhebt sich jedoch die Frage, ob neben ihren etwaigen Wirkungen auf sensible Nerven und kapillare Gefäße (oder ihren Nervenapparat!)[60] auch unter den unmittelbaren Zellwirkungen solche vorhanden sind, die spezifischer sind als es durch die Ausdrücke „Schädigung" oder „Abtötung" wiedergegeben wäre. Die vielfältige Abstufung der Erscheinungen bei der Einwirkung von „Reizstoffen" berechtigt dazu, diese Frage als ein pharmakologisches Problem zu stellen.

Selbstverständlich sind wir uns bewußt, daß auch mit der ersten Gruppierung nach den Angriffspunkten „sensible Nerven" und „Blutkapillaren"[60] die Differenzierung noch keineswegs weit genug getrieben ist. Eine höchst auffällige Erfahrung

[55] Druckrey u. Schreiber: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 208 (1938). [56] Stieve: Z. mikr.-anat. Forsch. **15**, 599 (1928); **23**, 571 (1931); **41**, 88 (1937). — [57] Chase: Amer. J. Physiol. **81**, 469 (1927); **85**, 527 (1928). — [58] Smith u. Hambourger: J. Pharmacol. (Am.) **57**, 43 (1936). — [59] Druckrey: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 208 (1938). — [60] Vgl. Heubner, W.: Ebenda **107**, 129 (1925).

auf dem Gebiete der „Kampfstoffe" hat z. B. gezeigt, daß die sensiblen Nerven der menschlichen Cornea und Bindehaut keineswegs durch die gleichen Substanzen am stärksten betroffen werden wie die sensiblen Nerven des Rachens und der Nase; ob dies ausschließlich aus physikalisch-chemischen Unterschieden der Substanzen abzuleiten ist oder ob nicht auch qualitative Empfindlichkeitsunterschiede der Nerven selbst beteiligt sind, sei mindestens dahingestellt. (Möglich wäre allerdings auch noch eine verschiedene anatomische Lagerung der Nerven als Ursache der genannten Differenz.) Bei der Reaktion der Blutgefäße ist sicherlich neben den kontraktilen Elementen ihrer Wand deren direkte nervöse Versorgung, wie auch der zentripetal leitende Nervenapparat, d. h. die „nutritive Gewebssensibilität" in Rücksicht zu ziehen, über die uns W. R. Hess[61] und A. Fleisch[62] aufgeklärt haben.

Was die „Zellen" selbst anlangt, liegen natürlich auch hier hochgradige Differenzierungen, daher auch Empfindlichkeitsunterschiede gegenüber verschiedenen chemischen Stoffen, von Tierart zu Tierart, wie von Zellart zu Zellart vor. Die Verschiedenheit der altbekannten Vorgänge der Leukotaxis und der Proliferation von Bindegewebszellen wird ja sowieso niemand überraschen. Auch ignorieren wir keineswegs die wichtigen Feststellungen von Carrel und Ebeling[63], sowie von Rolf Meier[64], nach denen gewisse aus einer Zellart stammende Stoffe für das Wachstum einer zweiten Zellart von größter Bedeutung sind. Wir glauben vielmehr, daß alle Erscheinungen von „Gewebsreizung" oder „Entzündung" nur durch das Zusammen- und Wechselspiel mehrerer Zellarten zustande kommen. Andererseits kann nicht daran gezweifelt werden, daß es „Zellreize" gibt, und zwar auch chemische für das Wachstum (vgl. oben S. 83, Coffein, ferner Jaques Loeb[65]). So harrt immer wieder die Sonderfrage der Erledigung: Wie und wo verknüpft sich die „Gewebsreizung" mit einer die Bindegewebszelle treffenden chemischen Erregung zu erneuter Proliferation, d. h. zu Wachstum.

II.

Solche Betrachtungen waren es, die es uns nicht überflüssig erscheinen ließen, unter abgeänderten Bedingungen nochmals zu prüfen, ob auch bei uns in der Reinkultur von Fibroblasten durch körperfremde, entzündungserregende Stoffe eine „Stimulation" des Wachstums hervorgerufen werden könne. Auch die Entscheidung im negativen Sinne schien uns wichtig für die richtige Auffassungsweise über das, was bei chemischer Reizung im Gewebe eigentlich vor sich geht. Von den wichtigen Ergebnissen von Paulmann[66] erhielten wir erst Kenntnis, als der Großteil unserer Versuche schon abgeschlossen war. Gleiches gilt von den Arbeiten eines amerikanischen Arbeitskreises[67], die uns wegen der Wichtigkeit der mitgeteilten Befunde der Nachprüfung dringend bedürftig erscheinen.

[61] Bruns Beitr. klin. Chir. **122**, 1 (1921). — [62] Siehe u. a. Kongreßbericht I d. XVI. internat. Physiol. Kongr. Zürich 1938, S. 9. — [63] Carrel u. Ebeling: J. exper. Med. **36**, 654 (1922). — [64] Meier, R.: Z. exper. Med. **87**, 283 (1933). — [65] Loeb, Jaques: Dynamik der Lebenserscheinungen. Leipzig 1906. — [66] Paulmann: Arch. exper. Zellforsch. **20**, 253 (1937); Biochem. Z. **300**, 153 (1939) — [67] Fardon, Norris Loofbourow u. Ruddy: Nature **139**, 539; Sperti, Loofbourow u. Dwyer: Ebenda **140**, 643 (1937); Loofbourow, Cook u. Stimson: Ebenda **142**, 573 (1938); Sperti, Loofbourow u. Lane: Science **86**, 611 (1937); Loofbourow u. Dwyer: Ebenda **88**, 191 (1938); Studies Inst. Divi Thomae (Cincinnati) **1**, 17, 41, 53, 79 usw. (1937 usw.).

Die Abänderung der Bedingungen erstrebten wir nach Übereinkunft mit Herrn Dr. Orzechowski in der Richtung, daß nicht mehr, wie in dessen Versuchen, die optimalen Milieubedingungen festgehalten wurden. Erstens sind ja gerade im entzündungsfähigen, lebenden Gewebe die Bindegewebszellen primär in Ruhe und nicht im Wachstum begriffen; zweitens war es a priori denkbar, daß günstige Milieubedingungen gewissermaßen die endogene Wachstumsenergie der Zellen bereits voll zur Auswirkung bringen, so daß ein neuer „Reiz" kein Plus hervorbringen kann. Wir wiederholten daher grundsätzlich die Versuche von Orzechowski, jedoch an solchen Fibroblastenkulturen, deren Wachstum eingeschränkt, gelegentlich sogar zum Stillstand gebracht worden war. Dies wurde nach bekannten Methoden [68] dadurch zu erreichen gesucht, daß im Kulturmedium der Embryonalsaft vermindert, außerdem in regelmäßigen Intervallen Heparin zugesetzt wurde.

Es wurden nur Flaschenkulturen von Fibroblasten aus dem Herzen von Hühnerembryonen benutzt, die auf Deckgläsern rein gezüchtet waren. Der Nährboden bestand aus $^2/_3$ Tyrode und $^1/_3$ Hahnenplasma, das durch Zusatz von 1 Tropfen 10%igen Embryonalextraktes zur Gerinnung gebracht war. Über diese erstarrte Phase von 1 ccm Gesamtinhalt wurde zweimal wöchentlich (nach vorherigem einstündigen Waschen mit 2 ccm Tyrodelösung) 4 Stunden lang eine flüssige Phase gebracht, die aus 0,5 ccm Hahnenplasma mit 10% einer 1%igen Heparinlösung bestand. Das Heparinpräparat war amerikanischer Herkunft. Zugleich wurde — an optisch vergrößerten Bildern — die Ausbreitung der Kultur planimetrisch gemessen. Unter diesem Vorgehen verlangsamten manche Kulturen ihr Wachstum mehr und mehr und kamen im Laufe von 2—4 Wochen ganz oder nahezu zum Stillstand, ohne jedoch abzusterben: Zugabe von Embryonalsaft vermochte in den „vorschriftsmäßigen" Fällen die Kulturen zu neuem Wachstum zu bringen. Zwei Beispiele dieser Art zeigt die Abb. 1a und b. Viele Kulturen blieben 6—8 Wochen in derselben Flasche am Leben, doch wurden die meisten nicht so lange messend verfolgt.

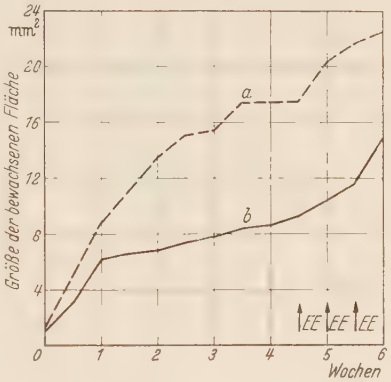


Abb. 1. Größe der bewachsenen Fläche als Ordinate. *EE*: Zugabe von Embryonalextrakt.

Für die Versuche mit Uabain-Zusatz wurden möglichst solche Kulturen ausgewählt, deren Wachstum frühzeitig abfiel oder aufhörte. Der Zusatz erfolgte durch Auflösung der gewünschten Konzentration in der flüssigen Plasmaphase. Die jedesmalige Gegenwart des Giftes betrug also 4 Stunden. Da die Kulturen unterhalb der festen Phase lagen, konnte die einwirkende Konzentration nur einen Bruchteil der zugegebenen betragen, und zwar bis höchstens ein Drittel von dieser (bei vollständiger Diffusion des Giftes in die feste Phase). Während der genannten Dauer von 4 Stunden mußte die auf die Kultur einwirkende Konzentration allmählich ansteigen.

Die Prozedur der zeitlich begrenzten Einwirkung des Pharmakons schien uns den bei chemischer Gewebsreizung gegebenen Bedingungen am besten zu entsprechen. Überdies war in den (Deckglas-) Versuchen von Druckrey und Schreiber eine fördernde Wirkung des Coffeins auf das Wachstum im wesentlichen erst nach Entfernung des Giftes aufgetreten. Auch fand Mizugaki[19] ein vermehrtes

[68] Fischer, Albert: „Gewebezüchtung." Handb. d. Biol. d. Gewebszellen in vitro. München, Verlag R. Müller & Steinicke, 1930.

Wachstum an Kulturen, die nur vorübergehend kurze Zeit in Ringerlösungen mit etwa 0,1—1% Äthylalkohol getaucht worden waren, während Kirihara[45] bei dauernder Gegenwart dieser Konzentrationen von Alkohol im Nährboden nur Hemmung des Wachstums sah. Die Einwirkungsdauer umfaßte in unseren Versuchen stets den 21. Teil derjenigen Periode, die zur Messung des Wachstums diente (4 Stunden gegen 84 Stunden).

Der Effekt des Uabains auf das Wachstum hätte an einer Änderung des zu erwartenden Kurvenverlaufes erkannt werden sollen, wobei allerdings der Begriff „des zu erwartenden Kurvenverlaufes" der Diskussion äußerst bedürftig ist (vgl. unten S. 89/90).

Über das Verhalten unbehandelter Kulturen wurde in einer Reihe besonderer Versuche Aufschluß zu gewinnen versucht. Überdies wurde in einer Anzahl von Versuchen das Verfahren geübt, jeweils nur die Hälfte einer Kultur in der geschilderten Weise zu behandeln, die andere Hälfte unbehandelt parallel weiterzuzüchten und mit der ersten zu vergleichen. Obwohl der unmittelbare Vergleich nicht erfolgreich war (vgl. unten S. 91/92), brachte dies Verfahren doch eine weitere Zahl von unbehandelten Kontrollkulturen zusammen, die für die Beurteilung der Grundlage des geübten Verfahrens mit verwandt werden konnten.

Die gegebenen Dosen von Uabain lagen zum Teil bei 10^{-7}, selbst 10^{-8}, d. h. unterhalb der von Orzechowski wachstumshemmend gefundenen Konzentration (10^{-6}); noch wesentlich tiefer lagen also dabei die einwirkenden Konzentrationen. Jedoch wurde in einem Teil der Versuche auch die Konzentration 10^{-6} und sogar 10^{-5} gegeben, bei denen einwirkende Konzentrationen bis schätzungsweise 10^{-7} und 10^{-6} angenommen werden können.

Die Zugabe des Uabains erfolgte in einem Teil der Versuche einmal, in anderen mehrmals mit längeren Abständen, in vier Reihen (mit 10^{-7}) mehrere Wochen lang bei jeder Waschung der Kulturen.

Im Wesen der in der geschilderten Weise angelegten Versuche liegt es, daß in vielen Fällen mit der Zeit ein Teil der angesetzten Kulturen ausfällt, somit innerhalb einer Reihe die Meßergebnisse seltener werden. Dies hat seinen Grund nicht nur in den unvermeidlichen Zwischenfällen durch gelegentliches Zerbrechen eines Glasgefäßes oder Infektion, sondern auch in Ereignissen innerhalb der wachsenden Kulturen selbst, die nicht vorauszusehen und nicht zu beherrschen sind. Ein Teil der Kulturen wuchs nämlich in späteren Perioden ganz aufgelockert ohne festen Zusammenhang mit der früher gleichmäßig erfüllten Fläche, so daß eine Messung des Wachstums durch Ausmessen der bewachsenen Fläche nicht mehr möglich war; bei anderen Kulturen trat eine Trübung des Nährbodens auf, die ebenfalls eine Messung verhinderte; endlich führte die wiederholte Waschung zuweilen zu einer solchen Lockerung der festen Phase des Nährbodens, daß die Kulturfläche eine völlig verzerrte Gestalt annahm (oft unter Schrumpfung). Alle solchen Kulturen mußten von der weiteren messenden Verfolgung ausgeschaltet werden.

Die zur Beurteilung übrigbleibenden Kulturen wurden ausgemessen und die erhaltenen Zahlen stets für eine Reihe gleichzeitig gezogener Kulturen zusammenfassend verwertet. Wo es ging, wurde nach der unter III. (vgl. S. 87) noch genauer angegebenen Methode nach Regeln der Statistik der „wahre mittlere Wert" berechnet.

In einer größeren Zahl von Versuchsreihen war jedoch die Zahl der brauchbaren Versuche so klein, daß die statistische Berechnung sinnlos schien; in anderen Fällen war in einem zu hohen Prozentsatz das Wachstum gleich Null (wie es ja — wenn auch nur selten mit Erfolg — geradezu erstrebt worden war). In allen diesen Fällen wurde statt des wahren mittleren Wertes der arithmetische Durchschnittswert angegeben. Der wahre mittlere Wert liegt bei unserem Material regelmäßig etwas niedriger als das einfache arithmetische Mittel. Dies hängt begreiflicherweise damit zusammen, daß der „Zuwachs" durch den Wert Null nach unten hin begrenzt ist.

III. Verhalten von Kontrollkulturen.

Um eine gesunde Basis für die Beurteilung der geprüften „Wirkungen" zu gewinnen, wurden sämtliche Versuche zusammengefaßt, die unter den beschriebenen Bedingungen unbehandelt einige Wochen in ihrem Wachstum verfolgt wurden. Die Bearbeitung der gemessenen Werte erfolgte nach gewissen Regeln der Variationsstatistik und zwar nach dem sehr bequemen Verfahren von Hazen [69], das in der deutschen biologischen Literatur neuerdings von Prigge [70] beschrieben, angewandt und empfohlen worden ist. Dementsprechend gingen wir in folgender Weise vor: Jeweils wurden sämtliche gleichartigen Werte (z. B. der Ausgangsfläche oder des Zuwachses in der ersten Hälfte der zweiten Woche usw.) ihrer Größe nach geordnet, darauf in etwa drei gleiche Gruppen geteilt und von denjenigen Werten, unterhalb deren ein, sowie zwei Drittel aller Werte lagen, die Logarithmen genommen. Diese beiden Zahlen wurden auf Wahrscheinlichkeitspapier (Schleicher & Schüll, Nr. 298½) abgetragen, senkrecht dazu der Prozentwert der Numeri (also etwa 33 oder 67%) aufgetragen und durch geradlinige Verbindung der erhaltenen Punkte und Ablesung des Schnittpunktes mit der 50%-Linie der Logarithmus des „wahren mittleren Wertes" gefunden *.

Die in dieser Weise ermittelten Zahlen sind auf Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2. Sämtliche Kontrollen.

Nr. der Halbwochenperiode nach dem Ansatz der Kultur	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Wert der Ausgangsfläche	Minimum	Maximum
			der Ausgangsfläche	
		mm²	mm²	mm²
	231	1,2	0,5	2,8
			Minimum	Maximum
		Wahrer mittlerer Zuwachs	des Zuwachses	
		mm²	mm²	mm²
3.	231	1,62	0,1	9,2
4.	229	1,38	0,0	9,3
5.	228	1,05	0,0	10,1
6.	202	0,66	0,0	7,3
7.	112	0,78	0,0	9,1
8.	70	0,92	0,0	8,2
9.	53	0,72	0,0	7,1
10.	29	0,40	0,0	4,8
11.	9	0,12	0,0	0,12

[69] Trans. amer. Soc. civ. Engr. **77**, 1539 (1914). — [70] Prigge: Dtsch. med. Wschr. **1937**, S. 1478; Klin. Wschr. **1939**, S. 337; Prigge u. Schäfer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 281 (1939).

* Bei der Einarbeitung in diese Methodik und den Berechnungen war uns Herr Dr. Havemann sehr behilflich, dem wir dafür unseren besten Dank abzustatten haben.

Von einer Berechnung des Wachstums in der ersten Woche nach Auspflanzung der Kultur ist abgesehen worden, weil dieses zu sehr von der zufälligen Größe der Anfangsfläche der Kultur abhängt. Für diese war der mittlere Wert 1,2 mm². Der Zuwachs (als Differenz der Kulturfläche am Anfang und Ende der angegebenen Zeitperiode) fällt von Beginn der zweiten bis zum Ende der dritten Woche regelmäßig ab, wie es unter den beschriebenen Züchtungsbedingungen ja erwartet werden muß. Das gleiche ist der Fall von Anfang der fünften bis zur Mitte der sechsten Woche; sogar die absolute Verminderung des Zuwachses bleibt in beiden Perioden für gleiche Zeiträume ungefähr konstant, bis schließlich das Wachstum beinahe

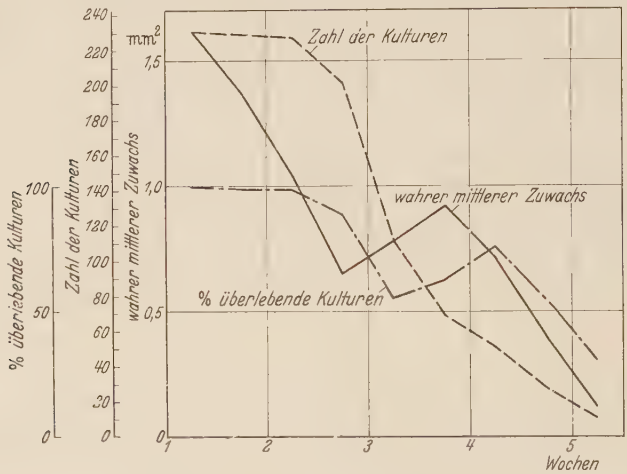


Abb. 2. Unbehandelte Kulturen (vgl. Text).

stillsteht. Zwischen diese beiden Perioden schiebt sich jedoch in der vierten Woche eine Periode ansteigenden Wachstums ein, was nicht ohne weiteres verständlich ist (vgl. Abb. 2). Achtet man auf die Zahl der zu den verschiedenen Zeiten verwendeten (d. h. vorhandenen) Kulturen, so fällt auf, daß diese gerade da am stärksten abfällt, wo der Anstieg des Wachstums einsetzt. Dies könnte darauf hindeuten, daß der Teil der ausgepflanzten Kulturen mit den geschilderten „Abnormitäten" in ihrem Wachstum grundsätzlich eine geringere Wachstumsenergie besitzt als die dann später übrigbleibenden Kulturen. Trägt man die Zahl der am Ende jeder Zeitperiode noch überlebenden Kulturen als Prozent der zu Beginn dieser Periode vorhandenen auf, so ergibt sich ein Verlauf, der dem der Wachstumsgröße analog ist (vgl. Kurve auf Abb. 2); nur liegen die Wendepunkte dieser Kurve um eine halbe Woche später als die der Kurve für den Zuwachs. Bedenkt man, daß die Funktion des Wachstums sich nur während des Lebens äußern kann, so wird verständlich, daß sich eine aus geringerer allgemeiner Vitalität ergebende Verminderung dieser Funktion zu einem früheren Zeit-

punkt geltend machen muß, als der aus dem gleichen Grunde eintretende Tod. Deshalb kann man wohl den gleichsinnigen Verlauf der Kurven wirklich auf eine einheitliche Ursache zurückführen und den Schluß ziehen, daß die schlechter wachsenden Kulturen auch früher absterben als die gut wachsenden. Mit dieser Annahme stimmt überein, daß in der 7. und 8. Halbwochenperiode auch das Maximum des Zuwachses gegenüber der Vorperiode wieder in die Höhe geht. So läßt sich die Erhöhung des mittleren Wertes für das Wachstum erklären. Der durchschnittliche Zuwachs in der halben Woche betrug vom Beginn der dritten bis Mitte der fünften Woche 0,83 mm². Diese Zahl beweist, daß die ursprüngliche Voraussetzung, von der aus an die Versuche

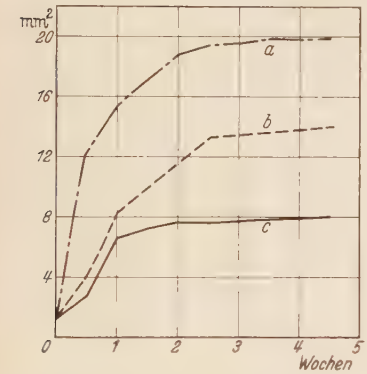


Abb. 3. Drei Beispiele von unbehandelten Einzelkulturen, deren Wachstum unter den gewählten Bedingungen zum Stillstand kam. Bewachsene Fläche als Ordinate.

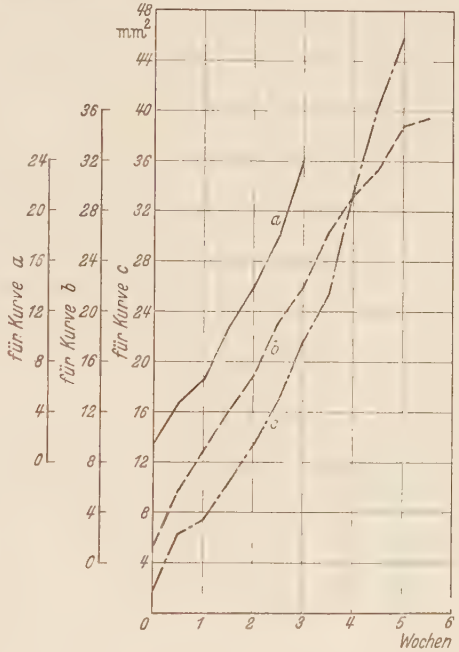


Abb. 4. Drei Beispiele von unbehandelten Einzelkulturen, deren Wachstum unter den gleichen Kulturbedingungen, wie in den Beispielen der Abb. 3, ungehemmt weiterging (Ordinate wie Abb. 3).

herangegangen wurde, nicht zutraf, daß es nämlich keineswegs gelang, in einer ausreichenden Zahl von Fällen und für einen Zeitraum von ausreichender Dauer vor dem Absterben einen völligen oder auch nur annähernden Stillstand des Wachstums herbeizuführen. Überdies verbirgt sich unter der Gesetzmäßigkeit der statistischen Zahlen eine außerordentlich große individuelle Variabilität im Verhalten der Einzelkulturen unter gleichen Bedingungen. Zwischen dem erwarteten und in einer Reihe von Fällen auch tatsächlich realisierten Stillstand des Wachstums — wie in den Beispielen der Abb. 3 — und einem ungehemmten geradlinigen Wachstum — wie in den Beispielen der

Abb. 4 — sahen wir alle denkbaren Übergänge. Das Unangenehmste war dabei, daß einzelne Kulturen überhaupt keinen einheitlichen Verlauf ihrer Wachstumskurve, vielmehr ganz unerwartet ohne sichtlichen Grund plötzliche Beschleunigungen des Wachstums erkennen ließen. Beispiele dafür gibt Abb. 5. Gewiß handelte es sich dabei um recht seltene Ausnahmen, doch war es natürlich störend, daß sie überhaupt vorkamen; diese plötzlichen „Ausbrüche" erfolgten meist in der Zeit zwischen $2^1/_2$ und $3^1/_2$ Wochen nach Ansetzen der Kultur, also in einer Zeitperiode, während der in den Hauptversuchen vernünftigerweise der Zusatz des zu prüfenden Mittels stattfinden mußte.

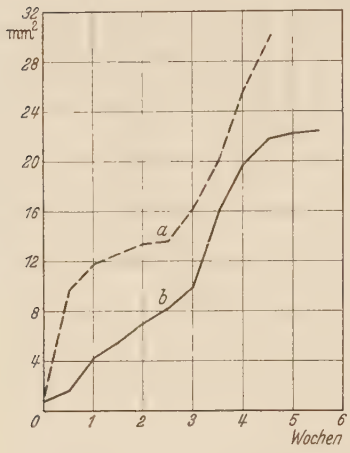


Abb. 5. Zwei Beispiele von unbehandelten Einzelkulturen, deren Wachstum anfangs gehemmt schien, doch plötzlich ohne erkennbaren Anlaß nach $2^1/_2$ und 3 Wochen wieder viel lebhafter wurde (Versuchsbedingungen und Ordinate wie auf Abb. 3).

Ein leidlicher — wenn auch keineswegs ausnahmsloser — Parallelismus zeigte sich, wie kaum anders zu erwarten, bei den gleichzeitig angesetzten Kulturen gleicher Herkunft auf gleichem Nährboden. Manche dieser Ansätze wuchsen im ganzen schneller, andere im ganzen langsamer.

Zwei auf Tabelle 3 zusammengestellte Beispiele machen dies deutlich.

Die Daten dieser beiden Versuche (Frühjahr und Sommer) entsprechen übrigens allgemeineren Erfahrungen bei der Gewebezüchtung aus Hühnerembryonen auf Hühnerplasma: regelmäßig ist im Sommer das Wachstum, selbst das Angehen der Kulturen schlechter als in anderen Jahreszeiten.

Tabelle 3. Zuwachs nach 3 Wochen (mm²).

Datum des Versuchsbeginns	Zahl der Kulturen	Zuwachs im Durchschnitt	Mittlere Abweichung	Maximum des Zuwachses	Minimum des Zuwachses
		mm²	mm²	mm²	mm²
7. VII. 1936	7	6,1	± 1,3	8,4	3,9
14. III. 1936	32	14,4	± 4,7	24,5	5,8

Bemerkenswert ist vielleicht, daß nach Zugabe von Embryonalextrakt in der 5. Woche fünfmal bei Kulturen der Flächengröße 9—18 mm² die Wachstumsgeschwindigkeit eindeutig wieder anstieg, während dies bei 3 Kulturen der Flächengröße 20 mm² ausblieb; vielleicht ist ein zu großes Tempo des vorherigen Wachstums der Wirkung des Embryonalextraktes abträglich.

Bei diesem Verhalten der Kontrollkulturen ist es selbstverständlich, daß Einzelbefunde gar nichts aussagen können und die Ergebnisse nach Applikation einer als wirksam gedachten Substanz mit größter Vorsicht gedeutet werden müssen.

IV. Versuche mit Uabain (g-Strophanthin) 10^{-8}.

Die Dosis von 10^{-8} Uabain wurde in einer Reihe von 16 Kulturen einmal am 14. Tage nach dem Ansetzen zugegeben (Versuch 1a), in einer zweiten Reihe von 29 Kulturen am 14. und 28. Tage (Versuch 2). In der ersten Reihe wurden sieben aus der Betrachtung ausgeschaltet, weil sie nach dem 14. Tage überhaupt kein Wachstum mehr aufwiesen, auch nicht nach Zusatz von Embryonalextrakt nach $31^1/_2$ Tagen. Sie blieben auf der geringen Flächengröße zwischen 2,9 und 6,2 mm² stehen, waren also wohl abgestorben oder irgendwie abnorm. Es bleiben also 44 Einzelversuche für die Auswertung übrig. Von diesen waren 15 am 14. III. 1935, 29 am 30. IX. 1935 angesetzt worden.

Tabelle 4. Uabain 10^{-8}.

Beginn des Versuchs 1 am 14. III. 1935 (Versuchsserien 1a und 1b).
Beginn des Versuchs 2 am 30. IX. 1935 (Versuchsserie 2).

Nr. der Halbwochenperiode	Versuchsserie 1a		Versuchsserie 1b (Kontrollen)		Versuchsserie 2	
	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Zuwachs mm²	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Zuwachs mm²	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Zuwachs mm²
3.	22	0,6	32	2,27	29	0,85
4.	16	0,29	32	2,02	29	0,24
5.	15	→1,82	32	1,58	29	→0,42
6.	12	0,48	32	0,76	29	0,52
7.	7	0,17 *	32	0,84	29	0,17
8.	6	0,3 *	17	0,63	29	0,19
9.	5	1,7 *	15	0,9	29	→0,09
10.	—	—	—	—	29	0,07
11.	—	—	—	—	29	0,22

* = arithmetisches Mittel.
→ = jeweilige Gabe von Uabain 10^{-8}.

Zur Versuchsreihe 1a (vom 14. III. 1935) wurden aus dem gleichen Material 32 Kontrollkulturen ohne Giftzusatz angesetzt (1b). Diese Zahlen sind in der Zusammenstellung der Tabelle 2 enthalten (vgl. auch Tabelle 3); sie sind dem Gesamtmittel näher als die beiden Versuchsreihen 1a und 2 in den giftfreien ersten beiden Wochen, die mit verschiedenem Material angesetzt wurden und doch unter sich recht gut zusammenstimmen. Die Zahlen zeigen, daß die benutzten Kulturen zunächst weit langsamer wuchsen als der Durchschnitt (vgl. Tabelle 2).

Das Wachstum in der Halbwoche nach der — einmaligen — Einwirkung von Uabain erscheint in diesen Versuchen höher als in der vorhergehenden, während dies bei den Kontrollen der Reihe 1b nicht der Fall ist. Die Steigerung ist allerdings in Versuch 1a ganz erheblich viel größer als in Versuch 2. In diesem ist bei Wiederholung der Einwirkung am 28. Tage jede gleichsinnige Wirkung zu vermissen.

V. Versuche mit wiederholten Dosen Uabain 10^{-7}.

Vier Reihen von Versuchen (vom 18. II. 1936, 12. II. 1935, 25. VI. 1936 und 28. XI. 1935 mit jeweils 7, 3, 28 und 48 Kulturen) wurden vom Beginn der dritten bis vierten Woche an regelmäßig bei der Waschung der Einwirkung von 10^{-7} Uabain ausgesetzt. Zu den drei erstgenannten Reihen wurde je eine Kontrollreihe ohne Uabain gezüchtet und messend verfolgt. Bei dieser Art des Vorgehens schienen uns die Bedingungen für eine allmähliche Anreicherung des Nährbodens mit Uabain bis in die Nähe der

Tabelle 5a. Uabain 10^{-7}.
Beginn des Versuchs 3 am 18. II. 1936.
Beginn des Versuchs 4 am 12. XII. 1935.

Nr. der Halbwochenperiode	Versuchsserie 3a		Versuchsserie 3b (Kontrollen)		Versuchsserie 4a		Versuchsserie 4b (Kontrollen)	
	Zahl der Kulturen	Arithmetisches Mittel	Zahl der Kulturen	Arithmetisches Mittel	Zahl der Kulturen	Arithmetisches Mittel	Zahl der Kulturen	Arithmetische Mittel
3.	7	0,8	13	1,5	3	0,8	6	0,9
4.	7	0,3	12	1,9	3	1,2	6	1,3
5.	7	0,2	12	1,3	3	0,5	6	1,2
6.	7	0,2	12	2,0	3	0,1	6	0,7
7.	7	→0,5	12	3,2	3	→0,1	5	0,9
8.	7	→0,4	12	2,5	3	→0,6	5	1,3
9.	7	→0,3	12	1,8	3	→0,5	5	0,5
10.	7	→0,3	12	1,0	3	→0,1	5	0,1
11.	—	—	6	0,4	3	→0,4	4	0,8
12.	—	—	—	—	3	→0,4	—	—

→ = jeweilige Gabe von Uabain 10^{-7}.

Tabelle 5b. Uabain 10^{-7}.
Beginn des Versuchs 5 am 25. VI. 1936.
Beginn des Versuchs 6 am 28. XI. 1935.

Nr. der Halbwochenperiode	Versuchsserie 5a		Versuchsserie 5b (Kontrollen)		Versuchsserie 6	
	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Zuwachs mm²	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Zuwachs mm²	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Zuwachs mm²
3.	28	1,72	18	1,50	48	0,81
4.	28	1,00	18	1,05	48	→0,20
5.	28	→0,54	18	0,69	47	→0,89
6.	28	→1,22	18	1,07	16	→0,89
7.	28	→0,99	18	1,27	16	→1,24
8.	26	→0,89	18	1,35	16	→1,38
9.	25	→0,34	18	0,62	16	→0,33
10.	22	→0,32	18	0,48	14	→0,54
11.	16	→0,25 *	—	—	12	→0,18
12.	14	→0,08 *	—	—	10	→0,79
13.	10	0	—	—	9	→0,94

* = arithmetisches Mittel.
→ = jeweilige Gabe von Uabain 10^{-7}.

applizierten Konzentration günstiger; denn selbst im besten Falle konnte das einstündige Auswaschen vor jeder neuen Applikation des Giftes nur zwei Drittel der vorher eingedrungenen Giftmenge entfernen. Allerdings bleibt unbekannt, ob sich das Uabain unter den Versuchsbedingungen nicht chemisch verändert.

Die gemessenen Wachstumswerte sind auf Tabelle 5a u. b verzeichnet. Betrachtet man zunächst die Kontrollreihen, so findet sich bei 3b und 4b vom 22. Tage ab, bei 5b vom 18. Tage ab ein stärkeres Wachstum als in der vorausgehenden Periode. Dies ist der Fall, ohne daß gleichzeitig die Zahl der beobachteten Kulturen merkbar kleiner wird. Diese Feststellung muß natürlich zu einer großen Skepsis gegenüber analogen Befunden führen, bei denen eine grundsätzlich gleiche Erhöhung des Wachstums nach Zugabe von Uabain angetroffen wurde. Dies war in der Reihe 3a vom 21., 4a vom 25., 5a vom 18. und 6 vom 14. Tage an tatsächlich der Fall — ebenso wie in dem bereits erörterten Versuch 1a und 2 am 14. Tage. Bei dieser Sachlage wagen wir aus den in den Uabainversuchen ermittelten Zahlen keine Schlußfolgerung in dem Sinne zu ziehen, daß die Einwirkung des Giftes die Ursache des vermehrten Wachstums gewesen sei.

Nicht verschweigen wollen wir, daß die Kulturen mit dieser regelmäßigen Uabainbehandlung mehrfach ein auffallend langdauerndes ungestörtes Wachstum zeigten, dessen Frist über die bei unbehandelten Kulturen gewohnte hinauszugehen schien. Ob dies ein reeller Effekt der Behandlung war oder auch nur ein Zufallsbefund, ist kaum zu entscheiden.

VI. Versuche mit Dosen von 10^{-6} und 10^{-5} Uabain.

24 Kulturen (vom 9. XI. 1936) wurden zu Beginn der 3. und 4. Woche je einmal für 4 Stunden mit der Konzentration 10^{-6} Uabain behandelt, zu Beginn der 5. Woche mit 10^{-5}. Mitte der 5., Anfang und Mitte der 6. Woche wurde Embryonalsaft zugegeben, woraufhin 22 Kulturen noch Wachstum zeigten (Serie 7a).

Tabelle 6. Uabain 10^{-6}, dann 10^{-5}.
Beginn des Versuchs 7 am 9. XI. 1936 (Versuchsserie 7a und 7b).

Nr. der Halbwochenperiode	Versuchsserie 7a		Versuchsserie 7b (Kontrollen)	
	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Zuwachs mm^2	Zahl der Kulturen	Wahrer mittlerer Zuwachs mm^2
3.	24	0,87	15	1,35
4.	24	1,2	15	1,7
5.	24	→ 0,25	15	1,07
6.	24	0,32	15	0,45
7.	23	→ 0,22	15	0,57
8.	23	0,21	15	0,32
9.	23	➤➤ 0,49	—	—

→ = jeweilige Gabe von Uabain 10^{-6}.
➤➤ = Gabe von Uabain 10^{-5}.

15 Kulturen des gleichen Datums und Materials (Serie7 b) wurden ohne Behandlung mit Uabain beobachtet, doch ebenso nach $4^1/_2$ Wochen dreimal mit Embryonalsaft versetzt; allerdings blieben in der 6. Woche nur noch 8 Kulturen übrig (während bis zur 5. alle 15 Kulturen gut gewachsen waren). Die interessierenden Ergebnisse beider Versuchsreihen finden sich auf der Tabelle 6. Der Gang des Wachstums in der Kontrollreihe liegt etwa in der Region des Ganges bei dem Mittel sämtlicher Kontrollen (Tabelle 2). Dem gegenüber hat es den Anschein, als ob die Konzentration 10^{-6} das Wachstum gehemmt, die Konzentration 10^{-5} dagegen gefördert hätte. Da aber ein solcher Befund allen sonstigen pharmakologischen Erfahrungen kraß widersprechen würde, muß man wohl annehmen, daß mindestens eines dieser Ergebnisse zufällig ist. Bei dauernder Gegenwart von 10^{-6} Uabain (g-Strophanthin) im Kulturmedium fand Orzechowski[1] das Wachstum von Fibroblasten im Laufe von 2 Tagen auf etwa die Hälfte reduziert. Bei der Zugabe von 10^{-5} konnten wir wohl wenigstens für die letzte Periode der Einwirkungszeit die Konzentration von 10^{-6} in der Nachbarschaft der Kultur erwarten. Vermutlich hat auch Manabe die gleiche Endkonzentration in seinem Kulturmedium gehabt als er eine Wachstumshemmung registrierte (vgl. oben S. 82).

VII.

In einer kleineren Reihe haben wir an Deckglaskulturen nochmals die Wirkung der hier in Frage kommenden Konzentrationen an Uabain geprüft, wenn sie im Nährboden dauernd gegenwärtig sind.

In bekannter Weise wurde je ein Tropfen Hahnenplasma mit einem Tropfen 10%igen Embryonalextraktes gemischt, denen in den Giftversuchen Uabain in der Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ und $2 \cdot 10^{-7}$ zugefügt war; im fertigen Nährboden wurde also die einfache Konzentration erreicht. Wiederum wurden jeweils Paare von Schwesterkulturen angesetzt, von denen ein Partner stets ohne weiteren Zusatz blieb, der zweite Partner in der ersten Reihe (8) ebenfalls, während er in der zweiten 10^{-7} (9), in der dritten 10^{-6} Uabain (10) ausgesetzt wurde. Nach 24 Stunden wurde der Zuwachs gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7. Deckglaskulturen.

Versuchsserie	Kulturhälften	Uabain	Zahl der Kulturen	Zuwachs im Durchschnitt		Wachstumsindex
				absolut mm²	im Verhältnis zur Ausgangsfläche	
8	a	0	5	$6{,}0 \pm 1{,}8$	$7{,}3 \pm 1{,}7$	
	b	0	5	$5{,}4 \pm 1{,}5$	$7{,}1 \pm 2{,}0$	
9	a	0	10	$6{,}2 \pm 1{,}2$	$7{,}0 \pm 1{,}2$	
	b	10^{-7}	10	$5{,}8 \pm 2{,}0$	$7{,}2 \pm 1{,}7$	1,03
10	a	0	10	$5{,}1 \pm 1{,}0$	$5{,}5 \pm 1{,}0$	
	b	10^{-6}	10	$0{,}6 \pm 0{,}7$	$0{,}6 \pm 0{,}3$	0,11

Auch diese Versuche haben also wie die Flaschenversuche von Orzechowski wieder ergeben, daß die schädigende Grenzkonzentration für Dauerwirkung bei 10^{-6} liegt und daß die 10mal geringere Konzentration keinerlei Stimulationseffekte erkennen läßt. Da diese Versuche methodisch mit denen von Manabe (33) übereinstimmen, bestärken sie uns in der Meinung, daß die von ihm verzeichneten Dosen etwa 10mal höher liegen als die in seinen Kulturen einwirkenden.

VIII.

Wie aus den vorhergehenden Ausführungen erkennbar ist, haben unsere experimentellen Bemühungen zu Befunden geführt, aus denen eine unbedingt sichere und überzeugende Schlußfolgerung nicht zu ziehen ist. Je nach der Einschätzung der nicht kontrollierbaren inneren Vorgänge in den wachsenden Zellverbänden und deren „zufälligen" Einflusses auf die gemessene Größe, also das zusammenhängend bewachsene Areal des Nährbodens, wird man aus verschiedenen der vielen gegebenen Zahlen eine Stimulation des Wachstums durch das angewandte Gift Uabain herauslesen oder alle diese Zahlen als nichtssagende Zufallsbefunde ansehen.

Bei dieser Lage der Dinge haben wir noch den Versuch gemacht, unser Material nach bestimmten Regeln der Statistik zu überprüfen, und zwar nach der Methodik von Hazen.

Zu diesem Zwecke haben wir unsere Zahlen auf andere Weise rechnerisch verwertet: Da der absolute Zuwachs einer Gewebskultur eine gewisse Abhängigkeit von der Masse des implantierten Ausgangsstückes hat, haben wir uns bemüht, die dadurch bedingten Unterschiede auszumerzen. Doch schien es uns nicht zweckmäßig, nach dem vielfach üblichen, auch von Orzechowski[1] gebrauchten Verfahren vorzugehen, bei dem der Quotient der jeweils bewachsenen Fläche zu der Ausgangsfläche berechnet wird. Wir hatten nämlich den Eindruck, daß gerade in der ersten Wachstumsperiode eine partielle Angleichung verschiedener Kulturen erfolgte, insofern aus sehr kleinen Stücken ein relativ größerer Zuwachs kam als aus großen. Die Größe des Ausgangsstückes hat also vornehmlich für die erste Wachstumsperiode Bedeutung. Deshalb wählten wir die nach zwei Wochen gemessene Fläche jeder Kultur als Bezugsgröße für alle in späteren Zeitpunkten erreichten Größen dieser Fläche.

Die in dieser Weise für jede einzelne Kultur und das Ende jeder Woche berechneten Quotienten wurden, so gut es ging, zu größeren Kollektiven zusammengefaßt. Dies geschah dadurch, daß wir mehrere Versuchsreihen, wenn sie nur mit der gleichen Dosis Uabain behandelt worden waren, einheitlich behandelten, d. h. die Zahlen für jeden Zeitpunkt nach dem Ansetzen der Kultur zusammen als ein Kollektiv nahmen. Für jedes dieser Kollektive wurde nach dem bereits oben erwähnten Verfahren von Hazen[69] (vgl. S. 87) der wahre mittlere Wert ermittelt. Diese Zahlen

wurden dann als Ordinate, die Zeit als Abszisse auf gewöhnliches Ordinatenpapier aufgetragen: die dabei erhaltenen Kurven gibt Abb. 6 wieder.

Bei dieser Bearbeitung ergab sich, daß die Streuung der Einzelwerte an sich nicht übermäßig groß war; die Neigung der zur Ermittlung jedes wahren mittleren Wertes gezeichneten Geraden gibt darüber Auskunft. Als Beispiele geben wir die für das Ende der 3. bis 5. Woche bei sämtlichen unbehandelten Kulturen sowie bei sämtlichen Versuchen mit 10^{-7} Uabain erhaltenen Ergebnisse wieder (vgl. Abb. 7 und 8). Die übrigen verhielten sich grundsätzlich ebenso.

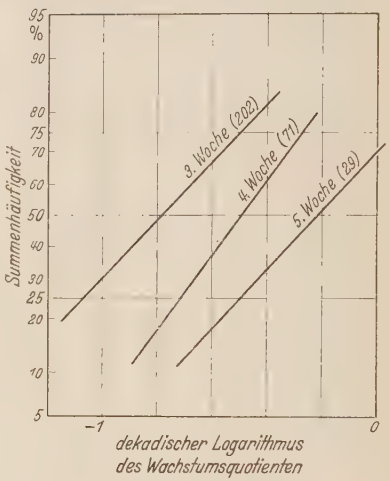


Abb. 7. Abszisse: Logarithmus der Werte für die Wachstumsquotienten unbehandelter Kulturen. Ordinate: Summenhäufigkeit in Prozent für die Kollektive von der Größe der eingeklammerten Zahlen. (Wahrscheinlichkeitspapier.)

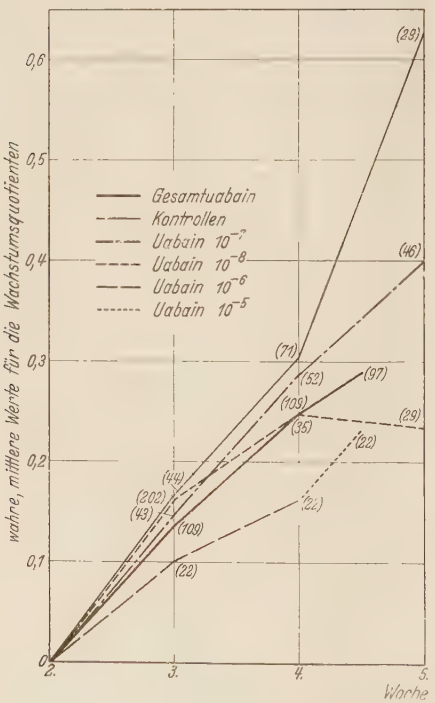


Abb. 6. Wachstumsquotienten (als Ordinaten). Jeder Punkt gibt den wahren mittleren Wert eines Kollektivs, dessen Größe durch die in Klammern beigefügte Zahl bezeichnet wird.

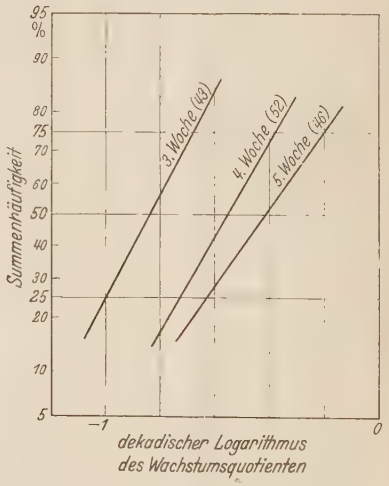


Abb. 8. Darstellung wie auf Abb. 7, jedoch Kulturen mit 10^{-7} Uabain behandelt.

Zur Beurteilung der Kurven auf Abb. 6 ist noch folgende Überlegung wesentlich: Bei der Anlage der Versuche waren wir, wie gesagt, anfangs

bedacht, nach Möglichkeit solche Kulturen der Behandlung mit Uabain zu unterwerfen, die von vornherein kein zu unbändiges Wachstum aufwiesen (wie es z. B. in Abb. 4 zum Ausdruck gebracht ist). Solche ungehemmt wachsenden Kulturen sind jedoch stets auch unter den Kontrollen aufgetreten und dort nicht besonders ausgemerzt worden. Wenn dieser Unterschied auch im weiteren Gang unserer Untersuchung keine so große Rolle mehr spielte, so ist doch zu folgern, daß das mittlere Wachstum unter den unbehandelten Kulturen größer sein muß als unter den mit Uabain behandelten.

Wie die graphische Darstellung zeigt, ist dies auch tatsächlich der Fall. Im übrigen ist die Lage der Geraden für die unbehandelten und die regelmäßig über Wochen hinweg mit 10^{-7} Uabain behandelten Kulturen so ähnlich wie man es sich nur wünschen kann. Eine Stimulation des Wachstums durch das Uabain daraus abzuleiten, ist nicht gut möglich. Bei der höheren Konzentration von 10^{-6} scheint bereits ein gewisser hemmender Einfluß vorzuliegen, denn bezüglich der Auswahl der verwendeten Kulturen lag zwischen den Versuchsreihen 10^{-7} und 10^{-6} keinerlei Unterschied vor. Bei diesen einigermaßen begründeten und vertretbaren Schlußfolgerungen wird man auf die Ergebnisse mit den Dosen 10^{-8} und 10^{-5} im Laufe der 5. Woche keinen besonderen Wert legen dürfen, sie vielmehr als Zufallsbefunde bewerten.

Zusammenfassung.

Die Gesamtheit der wiedergegebenen Versuche gestattet uns keinen anderen Schluß, als ihn Orzechowski bei seiner Art des Vorgehens ziehen mußte: Eine Stimulation des Wachstums ließ sich an Reinkulturen von Fibroblasten bei Einwirkung von Uabain (g-Strophanthin) nicht nachweisen. Dies gilt für einen Dosenbereich, der sich über 3 Dezimalen erstreckte. Die Bedingungen des Nährbodens waren so gewählt, daß ein optimales Wachstum im allgemeinen nicht möglich war; die Einwirkung des Giftes erfolgte nur temporär.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Versuche über chemische Zellreizung an Fibroblastenkulturen.

II. Mitteilung: Kupfersalz.

Von

Wolfgang Heubner und Emma Schreiber.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. Oktober 1939.)

I.

Durch Untersuchungen der japanischen Forscher Hirashima[1], Yamada[2] und Nitta[3] wurde unsere Aufmerksamkeit erneut auf Metalle als Katalysatoren, daher auch „Stimulantien" für Wachstumsvorgänge gelenkt. Sie arbeiteten an Hühnerfibroblasten auf Deckglaskulturen, die sie in solcher Größe gewannen, daß sie regelmäßig etwa 5 Tochterkulturen aus ihnen erhalten konnten. Von diesen wurde jeweils die eine als Kontrolle verwendet, die anderen mit je einer bestimmten Konzentration Metall in Form von Salz oder kolloider Aufteilung behandelt. Dabei erzielten sie Ergebnisse, die in übersichtlicher Form auf Abb. 1 wiedergegeben seien. Sie vertreten daher wiederum für diese Metalle die schon so oft für viele Substanzen vorgebrachte Behauptung, daß mit wachsender Konzentration zunächst ein Bereich durchlaufen werde, in dem das Wachstum begünstigt würde, ehe im Bereich der höheren Konzentrationen eine Schädigung erkennbar wird[4]. Der Bereich der Begünstigung soll mehrere Dezimalen von Dosen umfassen; auch sollen mit Leben und Wachstum noch Dosen vereinbar sein, die mehrere Dezimalen oberhalb des Optimums der Begünstigung liegen (vgl. die Daten über Sublimat auf Abb. 1).

Obwohl wir nach unseren reichlichen Erfahrungen daran zweifeln mußten, daß so klare und einheitliche Ergebnisse konstant reproduziert werden könnten, hielten wir es für wünschenswert, diese Ergebnisse nachzuprüfen. Wir wählten unter den Metallen das Kupfer aus, weil es als körpereigen auch in dem Sinne gelten muß, daß es für wichtige Umsetzungsprozesse unentbehrlich ist. A priori schien uns also eine künstliche Vermehrung dieses Metalls geeignet, einen Effekt hervorzubringen, der als „gesteigerte Leistung" anzusprechen wäre. Außer Flaschenkulturen benutzten wir hauptsächlich — wie die japanischen Forscher — Deckglas-

[1] Hirashima: Fol. pharmacol. jap. **19**, Breviaria 76 (1934); **20**, Br. 52 (1935). — [2] Yamada: Ebenda **22**, Br. 71 (1936). [3] Nitta: Ebenda **21**, Br. 62 (1936). — [4] Vgl. u. a. die Einleitung zur vorigen Arbeit, S. 79 f.

kulturen von Fibroblasten des Huhnes und die „klassische" Züchtungsmethode auf 1 Tropfen Hahnenplasma mit 1 Tropfen Embryonalsaft (zweites Zentrifugat). Unsere Abänderung bestand nur in Übernahme des vielfach bewährten Verfahrens der Kulturpaare, so daß für jede vergiftete Kultur eine Kontrollkultur gezogen wurde. Die Messung des Wachstums erfolgte täglich während einer dreitägigen Periode. In besonderen Versuchsreihen wurden noch andere Variationen geprüft: Ersatz des Embryonalsaftes durch Tyrodeflüssigkeit, damit die Wachstumsbedingungen nicht mehr optimal seien; Ersatz der Reinkulturen durch Mischkulturen aus frischen Embryonalorganen. Endlich haben wir Kulturen

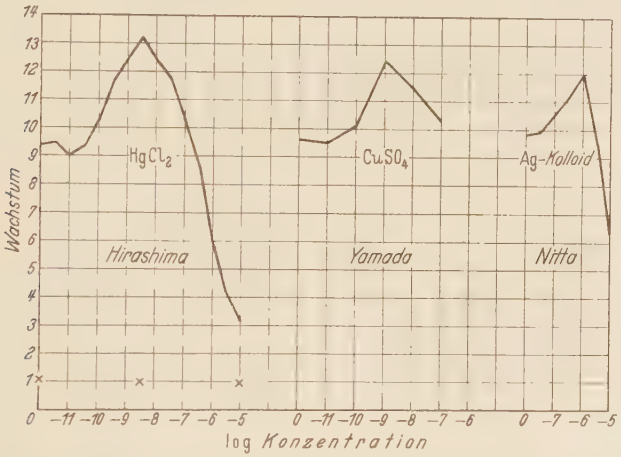


Abb. 1. Wachstumsquotienten von Fibroblastenkulturen für 48 Stunden nach japanischen Autoren; jeder Ordinatenpunkt bedeutet das Mittel von 10 gleichartigen Versuchen. Die Konzentration ist in Molen angegeben.

in mehreren aufeinanderfolgenden Passagen mit Kupfersulfat wachsen lassen; dabei wurde für jede Passage das Wachstum für die zweitägige Periode gemessen.

Die Konzentration des Kupfersulfates wählten wir in der Nachbarschaft der von Yamada als wirksamst angegebenen, nämlich 10^{-9} Mol $CuSO_4$ [$2{,}5 \cdot 10^{-7}$ ($CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$)]. Die Lösung des Salzes erfolgte zunächst in Tyrodeflüssigkeit. Diese wurde bei Deckglaskulturen aufs Zehnfache mit Embryonalsaft verdünnt und zu gleichen Teilen Plasma zugesetzt. In den Einzelversuchen geben wir diese endgültige Konzentration im Nährboden an.

Außer diesen Versuchen mit gelöstem Kupfersalz haben wir solche mit Kupferoxyd und Kupfermetall vorgenommen, weil sie uns eine gute Möglichkeit zu geben schienen, das Kupfer in abgestufter Konzentration zur Einwirkung zu bringen. Dabei wurde auch die Auswanderung von Leukocyten geprüft.

II. Flaschenversuche mit Kupfersulfat.

Reinkulturen von Herzfibroblasten wurden in Carrel-Flaschen gebracht und mit Plasma bedeckt. Nach $3^1/_2$ Tagen wurden sie mit Tyrode 1 Stunde ausgewaschen und zur Hemmung des Wachstums 4 Stunden einem Plasma, das 0,01 % Heparin enthielt, ausgesetzt. Nach viermaliger Wiederholung dieser Versuchsanordnung, also nach Ablauf von 2 Wochen, wurde dem Heparinplasma 10^{-8} Mol $CuSO_4$ zugesetzt und dies in gleichem Zeitabstand von $3^1/_2$ Tagen noch zweimal wiederholt. Die Kontrollen wurden ebenso behandelt, nur erhielten sie kein Kupfersulfat. Kontrollen und Versuchskulturen zeigten während dieser 10 Tage keinen erkennbaren Wachstumsunterschied.

III. Deckglasversuche mit Kupfersulfat.

Die Ergebnisse an den Deckglaskulturen sind in summarischer Form auf der Abb. 2 verzeichnet. Die Punkte der Kurven geben als Ordinate die

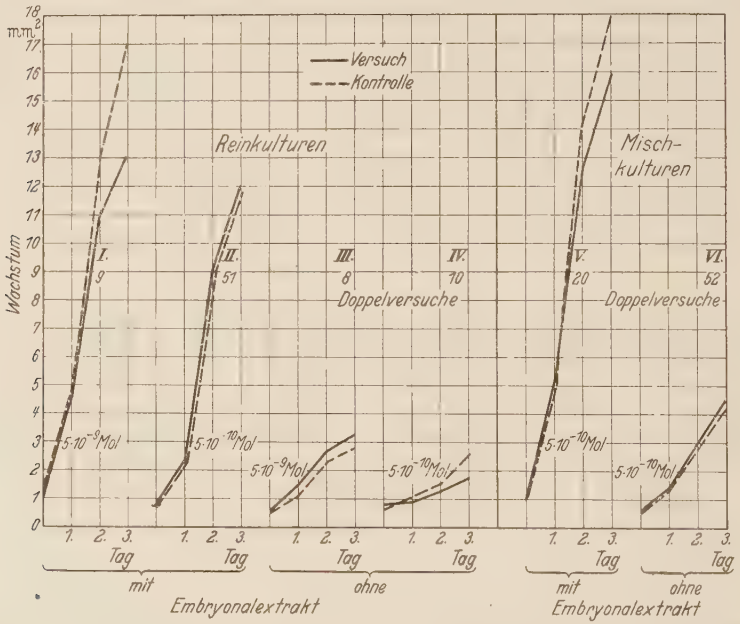


Abb. 2. Gewebskulturen auf Deckgläsern. Ordinate: Bewachsene Fläche. Ausgezogene Linien: Kulturen mit Kupfersulfat behandelt; gestrichelt: unbehandelte Kontrollkulturen. Römische Ziffern: Versuchsreihen. Arabische Ziffern: die jeweils angesetzten Einzelversuche (stets Kupferversuch + Kontrolle).

Mittelwerte des Zuwachses in der Fläche (mm^2) an, als Abszisse die nach der Überpflanzung vergangene Zeit in Tagen. Die angeschriebenen arabischen Ziffern nennen die Anzahl der einzelnen Kulturpaare, die in derselben Weise behandelt wurden. Die Abbildung 2 umfaßt 78 Paare von Reinkulturen und 72 Paare von Mischkulturen. Diese waren 4. Passage aus embryonalen

Herzen; in Versuchsreihe VI war bereits die dritte Passage ohne Embryonalextrakt gehalten worden. Die beiden größten Reihen II und VI wurden mit Embryonalsaft an Reinkulturen und ohne Embryonalsaft an Mischkulturen mit der Konzentration von $5 \cdot 10^{-10}$ Mol durchgeführt: in diesen Reihen decken sich die für die Kontrollen ermittelten (gestrichelten) Werte weitgehend mit denen der Kupferversuche.

In den übrigen Reihen sind die Abweichungen größer, weil die Zahl der Einzelversuche geringer ist. Jedoch läßt sich eine klare Überlegenheit des Wachstums unter Kupfereinfluß nicht erkennen: in der einzigen dahin deutenden Reihe III (mit $5 \cdot 10^{-9}$ Mol) war die Zahl der Einzelversuche am kleinsten; auch beträgt die Abweichung der Kupferversuche nach oben kaum mehr als 20% des Wertes, was noch nicht außerhalb der natürlichen Streuung liegt. Endlich ist zu beachten, daß die gleiche Konzentration von $5 \cdot 10^{-9}$ Mol in der Reihe I mit einer Abweichung im umgekehrten Sinne gegenüber den Kontrollen verknüpft war.

IV. Versuche mit Kupfersulfat an mehreren Passagen.

An 10 Kulturpaaren vom Herzgewebe wurde von der ersten Passage ab und weiter über drei weitere Passagen hin im Hauptversuch dauernd Kupfersulfat in der Konzentration $5 \cdot 10^{-10}$ Mol zugesetzt.

Für die zweite Passage wurden sämtliche anfallenden Kulturhälften, also nunmehr im ganzen 20 Kulturpaare benutzt, späterhin nur ein Teil von ihnen. Eine analoge Versuchsserie wurde unter Weglassen von Embryonalsaft durchgeführt, jedoch nur bis zur 3. Passage, weil danach das Wachstum nahezu stillestand. Die Ergebnisse sind auf Abb. 3 übersichtlich verzeichnet. Man könnte versucht sein, in den Reihen VII und XI eine Wachstumssteigerung unter Kupferwirkung sehen zu wollen; aber abgesehen von dem umgekehrten Ausfall des gleichartigen Versuchs V (auf Abb. 2) beträgt die Abweichung nach oben wiederum nur 20 und 28%. Wir können uns bei dem ganz regellosen Verlauf in den weiteren Passagen nicht entschließen, diese scheinbaren „Stimulationen" als reell anzusehen, betrachten sie vielmehr als Ergebnis der natürlichen Streuung.

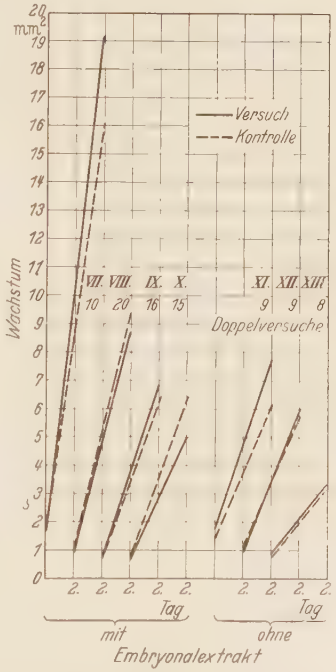


Abb. 3. Zwei Serien aufeinanderfolgender Passagen (VII bis X und XI bis XIII) aus Mischkulturen. Sonst Bezeichnung wie auf Abb. 2. Cu $= 5 \cdot 10^{-10}$.

In diesem Zusammenhang ist es vielleicht der Erwähnung wert, daß der von Yamada angegebene Höchstwert für die Wachstumssteigerung durch Kupfer ausgedrückt als „Wachstumsquotient" auch nur 29% höher liegt als der für die Kontrolle (ebenso beträgt der entsprechende Wert für Silber bei Nitta nur 24, der für Quecksilber bei Hirashima allerdings 42%).

V. Versuche mit Kupferoxyd und Kupfermetall.

Aus dünnem Kupferblech mit 99,6% deklariertem Gehalt an Cu wurden kleine viereckige Stückchen von etwa 1 mm Seitenlänge geschnitten. Sie wurden zum Teil ohne weitere Vorbereitung, zum Teil nach Glühen an der Luft, also nach gleichmäßiger Annahme der schwarzen Farbe des Kupferoxyds verwendet; in einer Reihe von Versuchen wurden die kleinen Stückchen erst unmittelbar vorher zurechtgeschnitten, nachdem das Blech im Wasserstoffstrom erhitzt, also von der etwa spontan gebildeten Oxydschicht befreit worden war. Ein Unterschied in der Wirkungsweise der metallischen und oxydierten Kupferstückchen ließ sich nicht erkennen. Auch erschien es ohne Bedeutung, ob das Metallstück in die gleiche Höhenschicht des Nährbodens eingelegt wurde wie die Zellkultur oder nicht.

Im ganzen wurden 279 Kulturen der Einwirkung solcher Kupferstückchen auf dem gleichen Nährboden ausgesetzt, daneben 197 Kontrollen beobachtet. Die Kontrollen waren stets Schwesterkulturen von Versuchskulturen. Die Zahlen verteilten sich auf 16 Versuchsreihen (XIV.–XXIX.), deren Anordnung nach verschiedenen Richtungen variiert wurde. Als lebende Objekte wurden verwendet embryonale Herzfragmente, Fibroblasten aus Herz und Knochen, sowie Leukocytenhäutchen von jungen Hähnen. Meist wurde das Metall zu gleicher Zeit wie der Kulturansatz auf den Nährboden gebracht, in einigen Versuchsreihen jedoch erst einen Tag später. In mehreren Versuchen kamen mehrere (2 oder 4) Fibroblastenkulturen zu gleicher Zeit auf einen Nährboden, wobei die Entfernung um das Kupferstück herum zwischen $^1/_2$ und 2 cm variiert wurde. Ferner wurde die Anordnung erprobt, daß Kupferstück und zwei Fibroblastenkulturen in einer geraden Linie hintereinanderlagen, damit durch das diffundierende Kupfer die näher liegende Kultur zuerst geschädigt wurde und etwaige Schädigungsprodukte Gelegenheit erhielten, bereits vor dem Kupfer auf die zweite, ferner liegende Kultur zu wirken. Endlich wurden auch Leukocyten gleichzeitig mit Fibroblasten und Kupfer auf einen Nährboden ausgepflanzt, oder nach mehrtägiger Einwirkung des Kupfers auf die Fibroblasten allein unter gleichzeitiger Fortnahme des Metallstückchens. Eine zahlenmäßige Übersicht über die angestellten Versuchsreihen gibt die Tabelle (S. 103).

Die Ergebnisse aller dieser Bemühungen waren ausschließlich in der einen Richtung deutlich, daß die Anwesenheit von Kupfer im Nährboden den Fibroblastenkulturen früher oder später schädlich wurde, während

Tabelle.

Versuchsreihe Nr.	Datum	Material	Kulturart	Sonstige Anordnung	Zahl der Kulturen	Zahl der Kontrollen
XIV.	30. XI. 1938	Kupferoxyd	Herzfragmente, Flasche	Mehrere zusammen in verschiedenem Abstand gleichzeitig	12	8
XV.	30. XI. 1938	Kupferoxyd	Herzfibroblasten, 4. Passage, Flasche	Je zwei zusammen gleichzeitig	10	10
XVI.	16. XII. 1938	Kupfermetall	Herzfibroblasten, 8. Passage, Flasche	Einzeln gleichzeitig	10	10
XVII.	23. IX. 1938	Kupfermetall	Osteoblasten, 10. Passage Flasche	Einzeln gleichzeitig	8	8
XVIII.	8. II. 1939	Reduziertes Kupfer	Herzfibroblasten, 16. Passage, Flasche	Einzeln gleichzeitig	10	10
XIX.	27. II. 1939	Reduziertes Kupfer	Herzfibroblasten, Deckglas	Je zwei geradlinig gleichzeitig	20	20
XX.	16. II. 1939	Reduziertes Kupfer	Herzfibroblasten, Flasche	Einzeln Cu nach 1tägigem Wachstum zugegeben	28	28
XXI.	24. II. 1939	Reduziertes Kupfer	Herzfibroblasten, Flasche	Gleichzeitig	26	26
XXII.	23. XI. 1938	Kupferoxyd	Leukocyten, Flasche	Mehrere zusammen gleichzeitig	30	10
XXIII.	17. I. 1939	Kupfermetall	Leukocyten, Flasche	Mehrere zusammen gleichzeitig	18	18
XXIV.	17. I. 1939	Reduziertes Kupfer	Leukocyten, Flasche	Mehrere zusammen gleichzeitig	18	—
XXV.	17. XI. 1938	Reduziertes Kupfer	Leukocyten, Flasche	Mehrere zusammen gleichzeitig	36	26
XXVI.	23. I. 1939	Reduziertes Kupfer	Herzfibroblasten, 10. Passage u. Leukocyten, Flasche	Zusammen gleichzeitig	15	15
XXVII.	23. I. 1939	Reduziertes Kupfer	Osteoblasten, 9. Passage u. Leukocyten, Flasche	Zusammen gleichzeitig	6	6

Tabelle (Fortsetzung).

Versuchsreihe Nr.	Datum	Material	Kulturart	Sonstige Anordnung	Zahl der Kulturen	Zahl der Kontrollen
XXVIII.	30. I. 1939	Reduziertes Kupfer	Herzfibroblasten, 12. Passage u. Leukocyten, Flasche	Unter Entfernung des Cu Leukocyten 1 Tag später als Fibroblasten eingepflanzt	36	14
XXIX.	3. II. 1939	Reduziertes Kupfer	Herzfibroblasten, 2. Passage u. Leukocyten, Flasche	Unter Entfernung des Cu Leukocyten 1 Tag später als Fibroblasten eingepflanzt	16	8

die — nur kürzere Zeit, etwa einen Tag, zu verfolgenden — Leukocyten nicht betroffen schienen. Nach 3, 4 oder 5 Tagen war regelmäßig die größere Zahl der dem Kupfer ausgesetzten Fibroblastenkulturen „geplatzt", der Nährboden stark gelockert oder ganz verflüssigt; dabei waren im allgemeinen die dem Kupfer am nächsten liegenden Kulturen früher betroffen als die ferneren. In der Zeit vor dieser offensichtlichen Schädigung ließ sich ein Stimulationseffekt ebensowenig erkennen wie an den ferner liegenden Kulturen bei Absterben der näheren. Auch kein vermehrtes Wachstum in einer bestimmten Richtung war jemals zu bemerken, obwohl die Gegenwart mehrerer Kulturen auf einem Nährboden oder die von Leukocyten neben geschädigten Fibroblasten jede denkbare Gelegenheit dazu hätte bieten können. Freilich ist nicht außer acht zu lassen, daß die schädigende Wirkung des Kupfers in vielen Versuchen schon relativ früh zur Geltung kam; nur ein Teil der nach der Tabelle angesetzten Versuchsreihen blieb soweit brauchbar, daß die mitgeteilten Schlußfolgerungen gezogen werden konnten.

Zusammenfassung.

Auch diese Bemühungen, am Wachstum von Zellkulturen eine Stimulation zu erhalten, sind erfolglos geblieben; die Behauptung, daß eine solche durch Einwirkung geringer Konzentrationen eines Metallsalzes hervorgerufen würde, haben wir — wenigstens für das Kupfer — nicht bestätigen können.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Versuche über chemische Zellreizung an Fibroblastenkulturen.

III. Mitteilung: Histamin.

Von

Wolfgang Heubner und Emma Schreiber.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. Oktober 1939.)

I.

Die Befunde von Druckrey und Schreiber[1], nach denen das Coffein der Fibroblastenkultur (vom Huhn) besonders dann einen starken Wachstumsantrieb gibt, wenn es vorübergehend einwirkt, veranlaßten uns, die Wirkung des Histamins auf die Zellkultur zu prüfen. Daß diese so elektiv wirksame Substanz in entsprechend hoher Konzentration auch für isolierte Zellen nicht gleichgültig ist, haben bereits Handovsky, du Bois-Reymond und v. Strantz[2] gezeigt. Wir hofften anfangs, die fermentative Zerstörung des Histamins durch Histaminase dazu verwenden zu können, die Substanz zu beliebiger Zeit im Nährboden auszuschalten, ohne dabei sonstige, während ihrer Einwirkungsdauer etwa entstandene wirksame Produkte zu beseitigen.

Über die Wirkungsweise der Histaminase sind zwei wichtige Tatsachen bereits bekannt, die sich auch uns sogleich aufdrängten: erstens besteht ein erhebliches Latenzstadium, ehe nach Vereinigung von Histamin und Ferment die zerstörende Wirkung beginnt[3]; zweitens besteht ein Optimum der Konzentration des Substrats für die Wirkung des Ferments[4]. Leider erwies es sich, daß diese Konzentration wesentlich geringer war als die geringste noch an der Gewebskultur wirksame. Es war daher nicht möglich, den ursprünglichen Gedanken zu verfolgen. Auf die Wiedergabe der von uns erhobenen Befunde verzichten wir, da sie nur die Angaben von Zeller[4] bestätigen können.

II. Wirkung des Histamins auf Zellkulturen.

Reingezüchtete Fibroblasten aus embryonalen Herzen und Knochen vom Hühnchen wurden in Carrel-Flaschen gezogen. Die Überpflanzung der Kulturstückchen erfolgte mit einem Tropfen Plasma, nachdem das zum

[1] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 208 (1937). — [2] Ebenda **100**, 273 (1924). — [3] Mc Henry u. Gavin: Trans. Roy. Soc. Canada **25**, V, 101 (1931); Biochem. J. **26**, 1365 (1932); vgl. u. a. auch Keeser: Dtsch. med. Wschr. **1939**, S. 94. — [4] Zeller, E. A.: Helvet. Chim. Acta **21**, 880; vgl. S. 886 (1938).

Schneiden der Mutterkultur gebrauchte Messer in 10%igen Embryonalsaft getaucht worden war. Gewöhnlich kamen zwei bis vier Kulturen in eine Flasche. Darüber wurde der Nährboden gegossen, der in jeder Flasche aus 0,35 ccm Hahnenblutplasma, 0,65 ccm Tyrodelösung und 1 Tropfen 10%igem Extrakt aus Hühnerembryonen bestand. Nach dem Gerinnen wurde er 2 Stunden mit 2 ccm Tyrodelösung im Dunkeln ausgewaschen. Danach kam für die Dauer von 4 Stunden als flüssige Phase zum Nährboden 0,5 ccm Heparinplasma (mit 0,02% Heparin). Dies wurde mit Abständen von $3^1/_2$ Tagen mehrmals wiederholt. In den Hauptversuchen wurde diesem Heparinplasma Histamin in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-2} zugefügt. Die Kontrollen wurden mit Ausnahme des Histaminzusatzes genau gleich behandelt. (Analoge Kulturen wurden — mit eigenen Kontrollen — unter Zusatz der den Histamindosen entsprechenden Torantilmengen angelegt.)

In etwa 90 Doppelversuchen (ohne Torantil!) ergab sich, daß Konzentrationen bis herab zu 0,1% Histamin in der flüssigen Phase, also maximal 0,03% in dem Gesamtnährboden, irgendeinen Einfluß auf das Wachstum nicht ausübten. Erst die zehnfache Konzentration (also maximal 0,3% Histamin im Nährmedium) bewirkte Degeneration von Zellen (mit viel Fett) in einem lockeren Wachstumshof; doch blieb die Ausdehnung dieses zweifellos abnormen „Hofes" völlig im Rahmen der Kontrollkulturen. Selbst diese hohe Konzentration bewirkte also nur eine Schädigung mäßigen Grades. Außerdem trat in einer sehr großen Zahl von Versuchen Verflüssigung oder wenigstens Erweichung des Nährbodens auf, so daß schon aus mechanischen Gründen das Wachstum verschlechtert wurde. Manche Kulturen verloren ihren Halt, vor allem aber erwies es sich trotz vielfacher Bemühungen als aussichtslos, neue Kulturen auf diese aufgelockerten, halbflüssigen Nährböden zu überpflanzen. Auch aus diesem Grunde mußte der Versuchsplan aufgegeben werden.

Übrigens verdient es angemerkt zu werden, daß die Größenordnung der Dosis, durch die die Fibroblastenkulturen deutlich geschädigt wurden, nahezu dieselbe war, die Handovsky und Mitarbeiter[2] an Kolpidien im gleichen Sinne wirksam fanden (etwa 0,1%).

III. Bakterienprodukte als Nähr- und Reizstoffe für Fibroblasten?

Eine Zufallsbeobachtung schien uns so eindrucksvoll, daß wir ihre Wiedergabe für erlaubt halten, obwohl sie nicht zu reproduzieren war: Von der 18. Passage sehr guter, flott wachsender Reinkulturen von Herzfibroblasten wurden am 3. Oktober 1938 60 neue Überpflanzungen in 20 Carrel-Flaschen vorgenommen (also je 3 Kulturen auf einen Nährboden). Die Nährböden bestanden wieder aus 0,3 cm^3 Hühnerplasma, 0,6 ccm Tyrodelösung und 0,1 ccm 10%igem Embryonalsaft als fester und 0,5 ccm Plasma mit 0,1 mg Heparin als (temporär applizierter) flüssiger Phase. Diese enthielt

in 5 Nährböden eine Histaminkonzentration von 10^{-3}, in 5 weiteren von 10^{-7}, in 10 Nährböden jedoch keinen weiteren Zusatz. Nach dreitägiger Bebrütung zeigte es sich, daß auf 18 Nährböden überhaupt keinerlei Wachstum eingetreten war, vielleicht weil das Plasma von einem ziemlich alten Hahn stammte. Darunter befanden sich auch 3 Flaschen der mit der höheren Histaminkonzentration angesetzten Reihe. Eine weitere Flasche war von Bakterien überwuchert, der Nährboden verflüssigt. Die letzte Flasche (der gleichen Reihe mit Histamin 10^{-3}) zeigte dagegen ein eigentümliches Bild: An verschiedenen Stellen des Nährbodens waren 6 Bakterienkulturen gewachsen, die nach ihrem Aussehen zwei Arten anzugehören

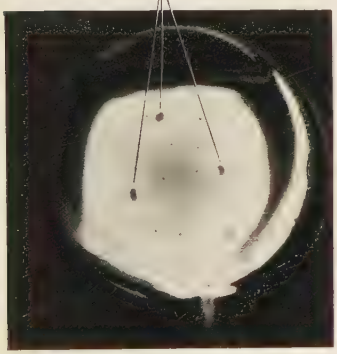


Abb. 1. Beispiel von Explantaten in Carrelflasche, die während 3tägiger Bebrütung keine Spur Wachstum aufwiesen.

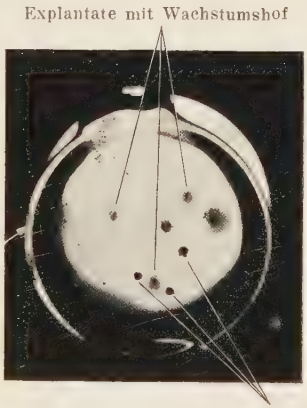


Abb. 2. Carrelflasche mit gleichem Nährboden, gleichen Explantaten und gleicher Bebrütungsdauer, wie in Abb. 1. Bakterienansiedlung.

schienen: zwei Kulturen hatten nämlich ein weißes, aufgelockertes, watteartiges Aussehen (Typus I), die vier anderen saßen als trockene, körnige, scharf begrenzte und leicht hellbraun getönte, runde Krusten von 1—2 mm Durchmesser auf dem Nährboden auf (Typus II). (Die vorher erwähnte verflüssigte Kultur wies eine Infektion auf, die ganz ausschließlich dem Typus I entsprach.)

Bemerkenswerterweise waren nun unter sämtlichen 60 Kulturen ausschließlich die drei in dieser Flasche enthaltenen Kulturen in völlig normaler Weise gewachsen: Die nach 3 Tagen erreichte Größe der bewachsenen Kulturfläche entsprach durchaus der sonst gewohnten; der Zuwachs betrug nämlich 5,9; 7,1 und 7,1 mm² bei Ausgangsflächen von 0,9; 1,3 und 1,3 mm². Vgl. Abb. 1 und 2.

Bei diesem Tatbestand ist man versucht, den Schluß zu ziehen, daß ein an sich für Fibroblasten unzureichender Nährboden durch die Bewachsung mit den beschriebenen Bakterien vollwertig wurde, daß also

die Bakterien Stoffe produzierten, die die Fibroblasten brauchten; man hätte also Bedingungen anzunehmen, wie sie in der belebten Natur ja keineswegs unbekannt sind, im Falle von Symbiosen sogar gesetzmäßig wiederkehren.

Wir haben versucht, dies Ergebnis durch Wiederholung zu erhärten. Auf unsere Bitte bemühte sich Herr Dr. Vierthaler vom Hygienischen Institut der Universität Berlin, die erwähnten Bakterienkulturen auf Bakteriennährböden fortzuzüchten, aus solchen Kulturen nach Aufschwemmung in einem besonderen Verfahren einzelne Bakterien herauszugreifen und auf Fibroblastennährböden zu überimpfen. Dabei war es jedoch nicht möglich, die zwei so verschiedenartig gewachsenen Formen festzuhalten, vielmehr trat immer nur ein watteartiges Wachstum auf, das die Nährböden rasch überwucherte und verflüssigte. Diese Bakterienart erwies sich als der Kartoffelbazillus. Wir sind Herrn Dr. Vierthaler für seine Bemühungen zu großem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

1. Histamin schädigt Fibroblasten in geringfügigem Ausmaß erst von Konzentrationen oberhalb 0,1% an; geringere Konzentrationen bleiben ohne Einfluß.

2. In einem Einzelfall wurde ein Wachstum von Fibroblasten auf einem an sich unzureichenden Nährboden dadurch erzielt, daß Bakterien den gleichen Nährboden besiedelten.

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Sofia.

Die Bedeutung der Blutgefäße und des Herzens für die Regulierung des Blutdruckes.

II. Mitteilung: Veritol. Wirkung auf die Blutgefäße, das Herz und den Blutdruck.

Von
T. Gotsev.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. September 1939).

Wie bekannt ist das Veritol — β-(p-Oxyphenyl)-isopropyl-methylamin — seiner chemischen Zusammensetzung nach dem Ephedrin und dem Adrenalin verwandt. In der letzten Zeit erschienen verhältnismäßig viele Arbeiten über das Veritol, und zwar sowohl experimentelle Untersuchungen an Tieren wie auch klinische Beobachtungen an Menschen.

Aus den Arbeiten von Rein (1, 2) ersieht man, daß sich der Blutdruck nach intravenöser Einspritzung von Veritol in Dosen von 0,05—0,2 mg pro kg erhöht. Diese Steigerung tritt nach einer Latenzzeit, die bedeutend größer ist als diejenige beim Adrenalin, ein. Im Verlauf von 2—5 Minuten erreicht der Blutdruck seinen Höhepunkt und bleibt für viel längere Zeit als beim Adrenalin auf einem beständigen Niveau.

Bezüglich der Wirkung des Veritols auf die Blutgefäße bei den Tieren findet Rein an erster Stelle eine Ausquetschung der Blutdepots. Die Zusammenziehung der Milz ist viel stärker ausgeprägt und dauert viel länger als beim Adrenalin. Veritol verursacht keine Störung der vasomotorischen Reaktionen, und die Organe leiden nicht unter Mangel an Blut. Die Steigerung des Blutdrucks rührt von der peripheren Wirkung des Veritols her, während die Veränderungen in der Herztätigkeit und diejenigen im Schlagvolumen als Folge des erhöhten Blutdrucks auftreten.

Zipf (3) fand mit Versuchen an Tieren, daß das Veritol Steigerung des Blutdrucks hervorruft, die je nach der angewandten Dosis von 3 bis 4 Stunden dauern kann. An isolierten Blutgefäßen des Kaninchenohrs haben Biehler (4) und Mügge (5) Vasokonstriktion beobachtet. Zipf (3) fand an Froschgefäßpräparaten bei einer Konzentration des Veritols von 1 : 50000000 bis 1 : 1000000 Zusammenziehen der Gefäße. Die Arterien der Extremitäten werden unter der Wirkung des Veritols tonisiert, und das Blut von den venösen Gefäßabschnitten der Extremitäten wird mobilisiert. Die Durchblutung der Niere wird sehr wenig beeinflußt: es tritt entweder keine Veränderung oder eine leichte Verstärkung auf. Das Volumen der Leber vergrößert sich. Die Milz zieht sich zusammen, wonach sie, gleich-

zeitig mit dem Absinken des Blutdrucks bis zum Ausgangsniveau oder etwas später, das normale Niveau wiedererlangt. Das Veritol ruft auch eine leichte Tonisierung der Mesenterialblutgefäße hervor; onkometrisch wird eine schwache Abnahme des Umfangs vom Dünndarm festgestellt. Der Druck in der V. portae wird erhöht, und dies ist, nach dem Verfasser, dem Auspressen der Milz und der vorübergehenden Vermehrung der zirkulierenden Blutmenge zuzuschreiben. Der Verfasser findet auch eine direkte Wirkung des Veritols auf das Herz, deutlicher ausgeprägt beim Insuffizienzherzen. Eine typische Veritolwirkung wurde auch am eviscerierten Tier beobachtet, bei dem die Därme und die Milz entfernt wurden und die Leber zirkulatorisch ausgeschaltet worden war. Die Steigerung des arteriellen Blutdrucks schreibt der Verfasser der Vermehrung der zirkulierenden Blutmenge zu, der Verbesserung der Herzleistung und der Tonisierung der arteriellen Gefäßabschnitte.

Klinische Beobachtungen an gesunden und kranken Menschen wurden von Schneider (6), Grosse Brockhoff und Kaldenberg (7), Dieckhoff (8), Robbers (9), Meyer und Spiegelhoff (10), Schneider und Kopp (11), Klostermeyer und Jonsson (12), Schöndorf (13), Parade (14), Zontscheff und Mawrodinoff (15) u. a. angestellt. Einige Verfasser stellen Vergrößerung des Schlagvolumens fest, wobei die meisten annehmen, daß das Veritol eine periphere Wirkung auf die Blutgefäße ausübt, derzufolge Verbesserung des Kreislaufs und Steigerung des Blutdrucks eintritt, und darum ist seine Anwendung in Fällen mit peripher bedingter Blutdrucksenkung von günstiger Wirkung.

Bei Untersuchungen an klinisch Kranken mit dem Stufentonosphygmographen stellten Sturm und Voges (16) fest, daß das Veritol in erster Linie eine reine Herzwirkung ausübt; es vergrößert das Schlagvolumen und die Blutdruckamplitude. Die Verfasser finden, daß das Gefäßsystem, trotz der Erhöhung des Blutdrucks, seinen Tonus unverändert beibehalten kann. Es wurde, sowohl bei Leuten mit normalem wie auch bei solchen mit erhöhtem Blutdruck, eine Verstärkung des venösen Zuflusses bemerkt. Das Veritol hat eine mäßige vasokonstriktorische Wirkung, die ziemlich bedeutenden individuellen Schwankungen unterworfen ist.

Der Zweck vorliegender Arbeit ist, die Beziehung zwischen den Veränderungen, die in den Blutgefäßen der beiden großen Gefäßgebiete — Bauchorgane und Extremitäten — eintreten, einerseits und den Veränderungen im Niveau des Blutdrucks andererseits, wie auch ferner die Beziehung zwischen den Veränderungen der Herztätigkeit und denjenigen des Blutdrucks zu erforschen.

Die Versuche wurden an 31 Hunden beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 6—16 kg angestellt. Zur Narkose wurde Luminalnatrium und Morphinäther verwendet. Man gebrauchte Veritol „Knoll“ in Dosen

von 0,1– 1 mg pro kg, die man den 2 cg Veritol sulfuricum enthaltenden Originalampullen entnahm und in die V. jugularis externa des Tieres einspritzte.

Die Technik ist dieselbe wie bei den Versuchen mit Histamin (I. Mitteilung). Die Versuche wurden immer am ganzen Tier ausgeführt. Für die Untersuchungen der Volumenveränderungen in den Bauchorganen bediente man sich der Onkographen von Orahovats und Popoff und für diejenigen der Extremitäten spezieller Plethysmographen mit Form und Größe der entsprechenden Extremität. Gleichzeitig mit den Volumenveränderungen der Organe wurde auch der Blutdruck in der A. carotis nach der Methode von Ludwig verzeichnet.

Die Technik der Eviscerierung, die bei einigen Tieren zur Anwendung kam, ist in der Arbeit über das Histamin (I. Mitteilung) beschrieben, und diejenige der Verkürzung des Blutkreislaufs in der Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **100**, 81 (1936).

Ergebnisse:

1. Blutdruck.

Die intravenöse Einspritzung von Veritol in Dosen von über 0,1 mg pro kg verursacht eine allmähliche Steigerung des Blutdrucks, die im Verlauf von 3—5 Minuten ihren Höhepunkt erreicht und dieses Niveau für mehr als 15 Minuten beibehält, manchmal sogar für 1—2 Stunden. Es werden jedoch auch Ausnahmefälle beobachtet, in denen der Blutdruck nur 2 -3 Minuten erhöht bleibt und auf das Ausgangsniveau sinkt, wie dies aus Abb. 1 zu ersehen ist. Vom Augenblick der Einspritzung in die V. jugularis ext. bis zum Beginn der Blutdrucksteigerung haben wir eine Latenzzeit, die viel länger ist als diejenige bei der Einspritzung von Adrenalin, Ephedrin u. a.; sie dauert manchmal 15—18 Sekunden. Es muß hierbei hervorgehoben werden, daß die Größe der Blutdrucksteigerung in durchaus nicht allen Fällen von der angewendeten Dosis abhängig ist. Manchmal zeitigen große Dosen eine schwach ausgeprägte Wirkung, zuweilen geben kleine Dosen eine anhaltende und bedeutende Blutdrucksteigerung. In einigen Fällen ist die Wirkung des Veritols stärker ausgeprägt, wenn der Blutdruck des Tieres ein niedrigeres Niveau hat, wie aus Abb. 2 und 5 ersichtlich; es werden jedoch auch Ausnahmen beobachtet, wo das Veritol in solchen Fällen keine große Wirkung erzielt. Das Absinken des Blutdrucks zum Ausgangsniveau geht allmählich, im Verlauf von Minuten, vor sich.

2. Blutgefäße.

a) Milz. Unter dem Einfluß des Veritols in den von uns angewendeten Dosen von über 0,1 mg pro kg tritt starkes Zusammenziehen der Milz mit bedeutender Abnahme des Umfangs des Organs ein. Die Zusammenziehung der Milz tritt plötzlich ein, und in dieser Beziehung, wie auch in bezug auf das Ausmaß der Zusammenziehung, ähnelt das Bild demjenigen

beim Adrenalin. In einigen Fällen beobachtet man vorübergehende leichte Entspannung der Milz mit Vergrößerung ihres Umfanges, was nicht länger als 15—20 Sekunden dauert, worauf plötzliche Zusammenziehung des Organs erfolgt (Abb. 3). Die Zusammenziehung der Milz hält lange an, viel länger als dies bei der Einspritzung von anderen Stoffen, wie Adrenalin Azethylcholin, Histamin u. a. beobachtet wurde. Die mittlere Dauer der Milzzusammenziehung ist 20—30 Minuten. Die Entspannung der Milz, bei der sich ihr Umfang allmählich vergrößert und sein ursprüngliches Ausmaß erreicht, geht nicht plötzlich, sondern allmählich, im Verlauf von 5—7 Minuten, vor sich. Manchmal folgt auf die Entspannung der Milz

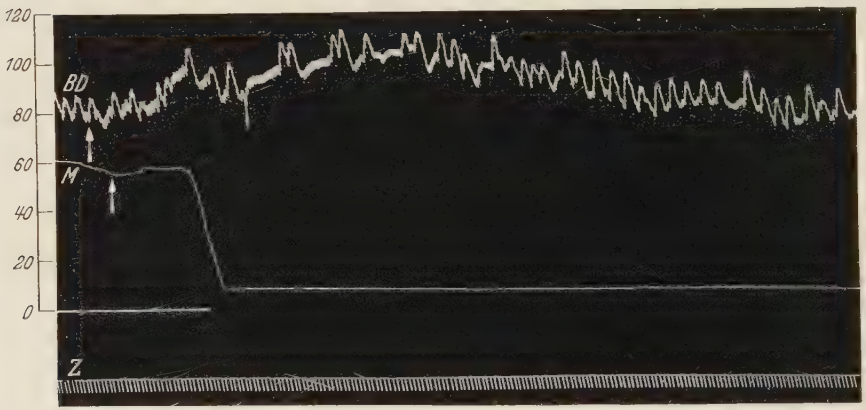


Abb. 1. 2. VIII. 1939. Hund, 6 kg, ♀. *BD* = Blutdruck in der A. carotis, *M* = Milzvolumen, 0 = Blutdrucknullniveau, *Z* = Zeit in Sek. Bei ▲ wurden 2 mg Veritol „Knoll" in die V. jugularis ext. injiziert.

bis zu ihrem ursprünglichen Ausmaß unmittelbar eine Vergrößerung über das Ausgangsniveau. Schon jetzt muß bemerkt werden, daß die Dauer der Zusammenziehung der Milz in durchaus nicht allen Fällen parallel mit der Erhöhung des Blutdrucks verläuft. In vielen Fällen entspannt sich die Milz und erreicht ihren ursprünglichen Umfang oder übertrifft ihn sogar, bevor noch der Blutdruck begonnen hat zu sinken. In einigen Fällen wiederum sinkt der Blutdruck bis zu seinem Ausgangsniveau, bevor sich die Milz noch entspannt hat. Die Zusammenziehung der Milz tritt entweder gleichzeitig mit dem Beginn der Blutdrucksteigerung oder 1—2 Sekunden später ein.

Auf Abb. 1 ist zu sehen, daß nach der Injektierung eines 6 kg schweren Hundes mit 2 mg Veritol die Milz sich zusammenzieht, und zwar geschieht dies plötzlich. Da die Zusammenziehung der Milz höchstgradig ist, zieht sich die Membran der Kapsel von Marey zusammen, der Registrierhebel fällt bis auf den Grund der Kapsel und verzeichnet weiterhin, während die Milz zusammengezogen ist. eine horizontale Linie. Bei diesem Versuch verharrte die Milz im Verlauf von 20 Minuten in zusammengezogenem

Zustand, wonach sie sich allmählich, innerhalb von 6 Minuten, entspannte. Die ganze Veränderung im Umfang des Organs dauerte 26 Minuten. Das in diesem Falle zu bemerken Wichtige ist die Tatsache, daß der Blutdruck, trotz der anhaltenden und starken Zusammenziehung der Milz, nur eine unbedeutende Erhöhung von 24 mm Hg aufwies, die nur $2^1/_2$ Minuten dauerte und dann auf das Ausgangsniveau sank. Einige Minuten später sank der Blutdruck unter das Ausgangsniveau, unabhängig davon, daß die Milz stark und langdauernd zusammengezogen blieb. Als etwas später die Wirkung des Veritols auf die Milz vorübergegangen war und diese sich bis zur Normalgröße entspannte, verharrte der Blutdruck auf einem

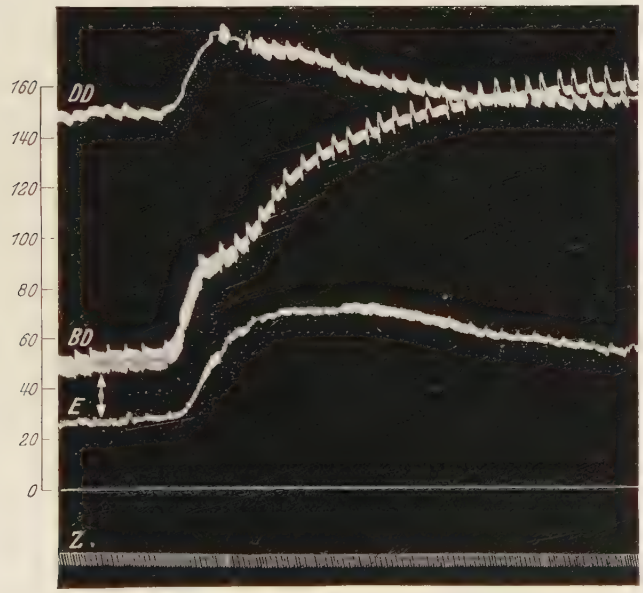


Abb. 2. 28. VI. 1939. Hund, 7 kg, ♀. *DD* = Dünndarmvolumen, *BD* = Blutdruck in der A. carotis, *E* = Extremitätsvolumen, 0 = Blutdrucknullniveau, *Z* = Zeit in Sek. Bei ↕ wurden 2 mg Veritol „Knoll" in die V. jugularis ext. injiziert.

beständigen Niveau, ohne von der Vergrößerung des Milzumfangs beeinflußt zu werden.

Die Veränderungen in der Größe der Milz, die nach intravenöser Anwendung von Veritol eintreten, können auch direkt, ohne jede Apparatur, beobachtet werden, wenn man nur die Bauchhöhle öffnet und die Milz beobachtet, ohne sie mit der Hand zu berühren. In diesem Falle sieht man, daß das Veritol eine starke Zusammenziehung der Milz verursacht, bei der ihr Umfang bedeutend abnimmt und ihre Oberfläche rauh wird. Aufeinanderfolgende Einspritzungen gleicher Dosen Veritol haben immer kürzere und kürzere Zusammenziehungen der Milz zur Folge.

b) Dünndarm. Bei den meisten unserer Versuche verursachte das Veritol eine passive Dilatation der Blutgefäße des Dünndarms, die entweder gleichzeitig mit dem Beginn der Blutdrucksteigerung oder 1–2 Sekunden später einsetzte (Abb. 2). Die Dauer der Dilatation ist verschieden: manchmal verläuft sie parallel mit der Blutdruckerhöhung, zuweilen ist sie kurz. In den Fällen, wo die Vasodilatation des Dünndarms stärker ist, wie dies gewöhnlich geschieht, kann man die Vasodilatation direkt am Darm bei geöffnetem Bauch ohne jede Apparatur beobachten. In diesen Fällen ist der Dünndarm stark gerötet (mit Blut überfüllt) und die Gefäße pulsieren stärker und häufiger.

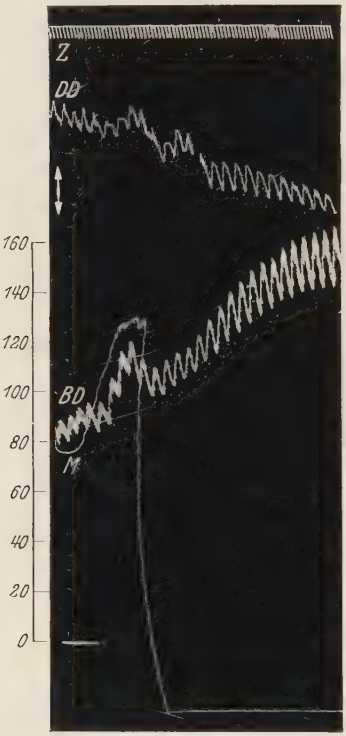


Abb. 3. 7.VIII.1939. Hund, 15 kg, ♀. Z = Zeit in Sek., DD = Dünndarmvolumen, BD = Blutdruck in der A. carotis, M = Milzvolumen, 0 = Blutdrucknullniveau. Bei ↕ wurden 4 mg Veritol „Knoll" in die V. jugularis ext. injiziert.

Nur in wenigen Fällen (ungefähr 10%) tritt eine leichte Vasokonstriktion des Dünndarms ein, die verhältnismäßig kurze Zeit — 2—5 Minuten — anhält und vorübergeht, unabhängig von dem Umstand, daß der Blutdruck lange Zeit danach erhöht bleibt (Abb. 3).

c) Nieren. Die Blutgefäße der Nieren erleiden in allen Fällen eine passive Dilatation, die ebenfalls nach dem Beginn der Blutdrucksteigerung anfängt und mit der Erhöhung des Blutdrucks mitgeht (Abb. 4). Die Größe der Dilatation der Nierengefäße hängt von der Größe der Blutdrucksteigerung ab; je höher der Blutdruck steigt, desto stärker ist die Dilatation. In keinem einzigen Falle wurde Vasokonstriktion beobachtet. Während das Adrenalin immer Vasokonstriktion der Nieren hervorruft, verursacht das Veritol nur Vasodilatation derselben.

d) Extremitäten. Auch an den Blutgefäßen der Extremitäten wird regelmäßig eine passive Dilatation beobachtet (Abb. 2). Diese tritt entweder zu derselben Zeit, da der Blutdruck zu steigen beginnt, oder kurz danach ein. Ihre Größe hängt von derjenigen der Blutdruckerhöhung ab. In den meisten Fällen ist die Vasodilatation der Extremitäten bedeutend und der Erhöhung des Blutdrucks parallel. Vasokonstriktion der Extremitäten wurde in keinem einzigen Falle beobachtet.

Die Veränderungen in den Blutgefäßen des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten, wie auch die Veränderungen im Umfang der Milz treten entweder gleichzeitig mit dem Beginn der Blutdrucksteigerung oder 1—2 Sekunden später ein. In keinem einzigen Falle jedoch gehen sie der Steigerung des Blutdrucks voraus.

Besprechung der Ergebnisse.

Aus dem Dargelegten geht klar hervor, daß der Blutdruck nach venöser Anwendung von Veritol steigt, unabhängig davon, daß große Gefäßgebiete, wie die des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten

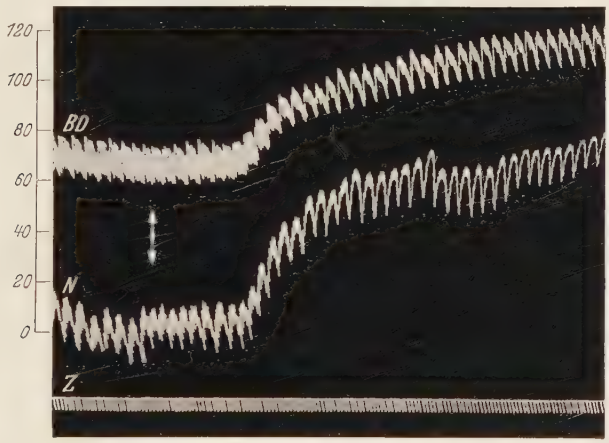


Abb. 4. 18. VIII. 1939. Hund, 12 kg, ♀. *BD* = Blutdruck in der A. carotis, *N* = Nierenvolumen, 0 = Blutdrucknullniveau, *Z* = Zeit in Sek. Bei ▲▼ wurden 2 mg Veritol „Knoll" in die V. jugularis ext. injiziert.

einer Dilatation unterworfen sind, und zwar in bedeutendem Maße. Das einzige der von uns untersuchten Organe, das sich zusammenzieht, ist die Milz. Diese Zusammenziehung ist stark und in den meisten Fällen langdauernd — Minuten —, und während der Milzzusammenziehung bei den Tieren wird, wie bekannt, eine erhebliche Menge Blut herausgedrückt und in die Peripherie getrieben, was nicht ohne Auswirkung auf das Niveau des Blutdrucks bleiben kann. In einigen Fällen jedoch, wie in dem auf Abb. 1 dargestellten, wird der Blutdruck trotz des anhaltenden starken Zusammenziehens der Milz wenig und für kurze Zeit erhöht, wonach er sein normales Niveau wieder einnimmt und sogar darunter sinkt. In anderen Fällen bleibt der Blutdruck, immer noch erhöht, auf einem beständigen Niveau, obgleich sich die Milz entspannt und ihr normales Ausmaß erreicht. Was die anderen Organe betrifft, so beobachteten wir

regelmäßig eine Vasodilatation, mit Ausnahme eines sehr kleinen Prozentsatzes mit schwacher Vasokonstriktion des Dünndarms, die verhältnismäßig kurze Zeit anhielt — fünf- bis sechsmal weniger als die Erhöhung des Blutdrucks dauerte. Die in dem Niveau des Blutdrucks eintretenden Veränderungen können nicht durch die in den Blutgefäßen der untersuchten Gefäßgebiete beobachteten erklärt werden. Der Blutdruck steigt dann, wenn sich die Blutgefäße des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten, und zwar in erheblichem Maße, erweitern. Wenn der funktionelle Zustand der Blutgefäße im Organismus der Hauptfaktor wäre, der die Erhöhung des Blutdrucks bedingt, so müßte bei Vorhandensein einer starken Vasodilatation Absinken des Blutdrucks erfolgen. Dies wird jedoch nicht beobachtet.

Man könnte annehmen, daß einige von uns nicht untersuchte Gefäßgebiete Veränderungen unterworfen sind, welche die Erhöhung des Blutdrucks bewirken. Diesbezüglich kann man voraussetzen, daß in einigen Organen, wie z. B. in der Leber, dem Magen, der Bauchspeicheldrüse, dem Gehirn, der Lunge, der Muskulatur und der Haut — außer derjenigen der Extremitäten — u. a. Vasokonstriktion eintritt. In solchem Falle müßte diese so stark sein, daß sie imstande wäre, die große Vasodilatation des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten zu kompensieren und außerdem den Blutdruck zu erhöhen. Mangels Untersuchungen anderer Gefäß gebiete können wir nicht sagen, was in ihnen vorgeht, wenn die von uns beobachteten Veränderungen eintreten.

Zur Klärung der Frage, welchen Anteil die Blutgefäße der Bauchorgane an der Erhöhung des Blutdrucks haben, wurde die Wirkung des Veritols auf den Blutdruck einiger Tiere untersucht, und zwar nach Eviscerierung der Tiere, d. h. nach Entfernung aller Bauchorgane, nämlich Magen, Bauchspeicheldrüse, Dünn- und Dickdarm, Milz, beider Nieren, und nach Ausschaltung des Blutkreislaufs der Leber vermittels Anlegen von Unterbindungen an die zu- und abführenden Blutgefäße der Leber. Bei Versuchen mit Veritol wäre es nicht möglich, die Resultate von der Wirkung des Veritols vor und nach der Eviscerierung ein und desselben Tieres zu vergleichen, weil, wie bekannt, das wiederholte Einspritzen der gleichen Dosen bei demselben Tier schwächere Veränderung des Blutdrucks erzeugt. Aus diesem Grunde begnügten wir uns mit nur einmaliger Injizierung von Veritol, und zwar nach der Eviscerierung. Bei diesen Versuchen beobachtete man, daß sich die Wirkung des Veritols auf dieselbe Weise äußert wie beim ganzen Tier mit unangetasteten Bauchorganen. Die Wirkung des Veritols war in diesen Fällen eine typische.

Es geht aus obenerwähnten Versuchen hervor, daß es nicht die Veränderungen in den Blutgefäßen der Bauchorgane sind, welche die Erhöhung des Blutdrucks nach der Einspritzung des Veritols bedingen.

Um festzustellen, welchen Anteil die übrigen Blutgefäße vom großen Blutkreislauf an der Erhöhung des Blutdrucks nehmen, wurde ein Versuch an einem Tier mit unterbrochenem Blutkreislauf angestellt. Dies geschah auf solche Art und Weise, daß vom gesamten Blutkreislauf des Tieres praktisch nur der Lungenkreislauf und derjenige der Bauchorgane in Tätigkeit blieb. Der Blutdruck wurde in dem Gummischlauch gemessen, der den Anfangsteil der Aorta descendens mit demjenigen der Aorta abdominalis verbindet. In denselben Gummischlauch wurde auch der untersuchte Stoff eingespritzt.

Auch bei den Versuchen mit verkürztem Blutkreislauf wurde beobachtet, daß die Wirkung des Veritols auf den Blutdruck immerhin bewahrt

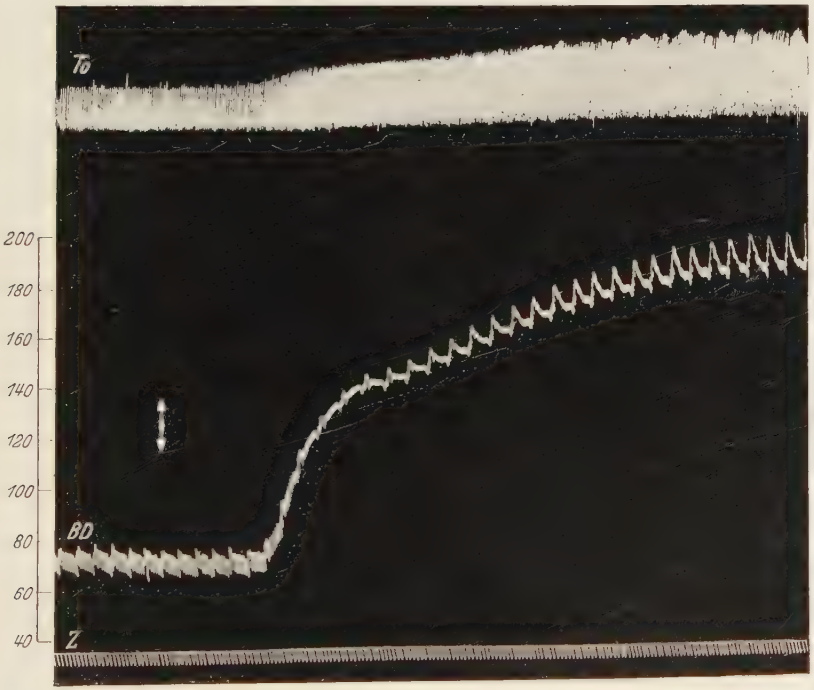


Abb. 5. 14. VIII. 1939. Hund, 16 kg, ♀. *To* = Tonogramm der linken Kammer, *BD* = Blutdruck in der A. carotis, *Z* = Zeit in Sek. Bei ↕ wurden 10 mg Veritol „Knoll" in die V. jugularis ext. injiziert.

wird. Die Erhöhung des Blutdrucks ist genügend ausgeprägt. Daraus geht hervor, daß die Ursache für die Erhöhung des Blutdrucks entweder in Veränderungen, die im Zustand der Blutgefäße der Lunge eingetreten sind, oder in Veränderungen der Herztätigkeit zu suchen ist.

Um die in der Herztätigkeit eintretenden Veränderungen festzustellen, wurden bei einigen Tieren gleichzeitig die Veränderungen in der Herztätigkeit und diejenigen im Niveau des Blutdrucks untersucht. Zu diesem Zwecke wurden zur selben Zeit die Höhen des Tonogramms der linken Kammer und die Veränderungen im Niveau des Blutdrucks nach der in der I. Mitteilung beschriebenen Technik verzeichnet. Den Tonographen führt man in die linke Herzkammer ein, ohne den Brustkorb des Tieres zu öffnen. Nach Registrierung des Ausgangsniveaus des Blutdrucks und der Höhe des Tonogramms injiziert man in die V. jugularis ext. eine bestimmte Dosis Veritol. Die Veränderungen verzeichnet man unaufhörlich.

In allen Fällen beobachtet man eine vollkommene Wechselbeziehung zwischen den Veränderungen in der Herztätigkeit und denjenigen im Niveau des Blutdrucks. Gleichzeitig mit der Erhöhung des Druckes tritt eine Beschleunigung und Vergrößerung der vom Herzen geleisteten Arbeit ein. Je höher der Blutdruck steigt, desto mehr nimmt die Größe der Arbeit des Herzens zu. Wenn das Niveau des Blutdrucks seinen Höhepunkt erreicht, dann erreicht auch die Größe der Herztätigkeit ihr Maximum und behält dieses Niveau bei, bis der Blutdruck zu sinken beginnt (Abb. 5). Mit dem Sinken des Druckes zugleich verringert sich allmählich auch die Herzarbeit, die ihr normales Niveau erst dann erreicht, wenn der Blutdruck auf sein früheres Niveau zurückgekehrt ist. Es herrscht völlige Parallelität zwischen den Veränderungen in der Herzarbeit und der Höhe des Blutdrucks.

Daraus geht hervor, daß der Hauptgrund für die Erhöhung des Blutdrucks durch Veritol eine Veränderung in der Herztätigkeit ist. Die Blutgefäße spielen eine zweitrangige und unbedeutende Rolle. Die Blutgefäße der Extremitäten und der Nieren erweitern sich in allen Fällen, die des Dünndarms in der Mehrzahl der Fälle; die Milz zieht sich regelmäßig zusammen. Der Blutdruck steigt auch bei eviscerierten Tieren, bei denen außer den anderen Organen auch die Milz herausgenommen worden ist. Auch bei Tieren mit verkürztem Blutkreislauf, wo nur die Zirkulation zwischen dem Herzen, der Lunge und den Bauchorganen beibehalten ist, wird der Blutdruck erhöht.

Zusammenfassung.

1. Veritol verursacht in Dosen von über 0,1 mg pro kg Erhöhung des Blutdrucks, welche nach einer Latenzzeit von einigen Sekunden — bis 18 — eintritt. Die Steigerung geht langsam vor sich; im Verlauf von 3—5 Minuten erreicht das Niveau des Blutdrucks seinen Höhepunkt. Der erhöhte Blutdruck hält längere Zeit an — bis 1—2 Stunden. Es gibt jedoch Ausnahmen, wo er viel kürzere Zeit dauert. Das Absinken des Blutdrucks geht langsam, allmählich vor sich; er erreicht das Ausgangsniveau und verharrt auf ihm.

Das Ausmaß der Blutdrucksteigerung hängt nicht in allen Fällen von der Größe der angewandten Dosis ab. Diesbezüglich gibt es auch individuelle Ursachen.

2. Das Veritol zieht die Milz zusammen. Das Zusammenziehen setzt entweder gleichzeitig mit der Blutdrucksteigerung oder 1—2 Sekunden nach ihrem Beginn ein. Es geschieht plötzlich; manchmal geht ihm kurzwährende Entspannung des Organs voraus. Die Zusammenziehung der Milz ist sehr stark ausgeprägt und dauert lange, durchschnittlich 20 bis 30 Minuten. Die Entspannung der Milz bis zu ihrer normalen Größe geht langsam vor sich, in keinem Falle plötzlich, wie dies beim Adrenalin beobachtet wird. Manchmal folgt leichte sekundäre Vergrößerung des Milzumfanges. Die Dauer der Zusammenziehung der Milz steht nicht in Zusammenhang mit der Dauer des erhöhten Blutdrucks. In den meisten Fällen dauert die Veränderung im Blutdruck länger als die des Milzumfanges; selten sind die Fälle, in denen die Blutdruckveränderung kürzere Zeit anhält als die Zusammenziehung der Milz.

Die Blutgefäße des Dünndarms zeigen meistens eine passive Dilatation, die parallel mit der Erhöhung des Blutdrucks verläuft und deren Ausmaß von der Höhe des Blutdrucks abhängt. Seltener beobachtet man leichte und verhältnismäßig kurzdauernde Vasokonstriktion.

In allen Fällen ohne Ausnahme verursacht das Veritol passive Vasodilatation der Nieren und der Extremitäten. In keinem einzigen Falle wurde Vasokonstriktion festgestellt.

3. An eviscerierten Tieren erhöht das Veritol den Blutdruck so wie an ganzen Tieren.

4. Bei Tieren mit verkürzter Blutzirkulation, bei denen vom großen Blutkreislauf nur die Blutversorgung der Bauchorgane aufrechterhalten ist, bleibt die Wirkung des Veritols auf den Blutdruck dieselbe.

5. Das Veritol ruft Beschleunigung und Vergrößerung der Herztätigkeit hervor. Diese Veränderungen verlaufen parallel mit der Steigerung des Blutdrucks: Wenn das Niveau des letzteren seinen Höhepunkt erreicht, so gelangt auch die Herzarbeit zu ihrem Maximum, auf welchem Niveau sie verharrt, bis der Blutdruck zu sinken beginnt. Das Absinken des Blutdrucks bis zum Ausgangsniveau wird von Verringerung der Herzarbeit ebenfalls bis zum Ausgangsniveau begleitet. Es herrscht vollkommene Parallelität zwischen den Veränderungen der Herztätigkeit und denjenigen im Niveau des Blutdrucks.

Die Ursache für die Erhöhung des Blutdrucks durch Veritol liegt in den eintretenden Veränderungen der Herztätigkeit. Die Blutgefäße spielen hierbei eine unbedeutende Rolle.

Literatur.

1) Rein, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 617, 1937. — 2) Rein, H.: Klin. Wschr. **1937**, S. 700. — 3) Zipf, K.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 679 (1938). — 4) Biehler, W.: Z. exper. Med. **101**, 62 (1937). — 5) Mügge, H.: Klin. Wschr. **1937**, Nr. 16, S. 1241. — 6) Schneider, D.: Ebenda **1937**, S. 736. — 7) Grosse Brockhoff u. Kaldenberg: Ebenda **1937**, S. 948. — 8) Dieckhoff: Ebenda **1937**, Nr. 33, S. 1154. — 9) Robbers, H.: Münch. med. Wschr. **1937**, Nr. 21, S. 819. — 10) Meyer u. Spiegelhoff: Klin. Wschr. **1937**, Nr. 39, S. 1342. — 11) Schneider u. Kopp: Ebenda **1937**, Nr. 48, S. 1672. — 12) Klostermeyer u. Jonsson: Ebenda **1937**, S. 1724. — 13) Schöndorf: Münch. med. Wschr. **1938**, Nr. 9, S. 333. — 14) Parade: G.: Klin. Wschr. **1938**, S. 479. — 15) Zontscheff u. Mawrodinoff: Clinica Bulgara, Sofia, 1938, S. 377. — 16) Sturm, A., u. H. Voges: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 331 (1938).

Aus der 1. medizinischen Klinik (Vorstand: Prof. R. Siebeck) und dem Pathologischen Institut (Vorstand: Prof. R. Rössle) der Universität Berlin.

Untersuchungen zur Toxikologie des 4.4'-Dioxy-α. β-Diäthylstilbens.

Von

O. Arnold und **H. Hamperl.**

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 27. Oktober 1939.)

I. Einleitung.

Seit dem Bekanntwerden der starken östrogenen Wirkung des 4, 4'-Dioxy-α,β-Diäthylstilben (Diäthylstilböstrol). auf die Dodds und Mitarbeiter (1) zuerst hinwiesen. hat diese Substanz große Beachtung gefunden. Sowohl im Tierversuch [u. a. A. Loeser (2), Kreitmair und Sieckmann (3). Grabe (4)] wie bei der klinischen Untersuchung [u. a. Guldberg, Buschbeck und Hausknecht, Engelhart, Loeser, Winterton und Mac Gregor (5)] konnte festgestellt werden, daß der synthetische Brunststoff Diäthylstilböstrol fast sämtliche vom körpereigenen weiblichen Sexualhormon bekannten Wirkungen ausübt und diese teilweise sogar übertrifft. Dies gilt sowohl für die Wirkung auf die engere Genitalsphäre als auch für die vom Follikelhormon ausgeübten Allgemeinwirkungen.

Die Toxikologie des Diäthylstilböstrols wurde von Loeser an Ratten eingehend untersucht. Als wichtigstes Ergebnis fand er bei Anwendung von großen Dosen toxische Leber- und Nebennierenveränderungen. Ähnliche Beobachtungen liegen von Lacassagne (9) vor. der eine ikterische Verfärbung der Versuchstiere beobachtete. Loeser und Grumbrecht (10) haben die Wirkung des Dioxy-α,β-Diäthylstilbens mit der von Östron und Östradiol bei peroraler Verabreichung an Ratten verglichen. Dabei fand sich, daß toxische Veränderungen in der Leber und der Nebenniere allein vom Diäthylstilböstrol verursacht wurden. Weiterhin zeigten die untersuchten Substanzen eine verschiedene Wirkung auf die Ausbildung der Brustdrüsen: in der Versuchsserie mit Diäthylstilböstrol trat erst nach 45 Tagen eine Proliferation am Brustdrüsengewebe auf. während bei Östronbehandlung schon nach 12–18tägiger Behandlung eine Umbildung der Brustdrüse zu beobachten war. Auch die Verhornung des Scheidenepithels trat bei Verabreichung gleicher Gewichtsmengen von Östron.

Östradiol und Diäthylstilböstrol bei letzterem Stoff am spätesten auf. Bei den Versuchen mit Dioxydiäthylstilben war dagegen im Gegensatz zu den Versuchen mit Östron und Östradiol eine vorzeitige cystische Atresie der Follikel festzustellen.

Die Wirkung großer Mengen des weiblichen Sexualhormons auf die Blutbildung ist zum ersten Male von Arnold, Holtz und Marx (6) untersucht worden: eine tägliche intramuskuläre Injektion von Östradiolmonobenzoat verursacht beim Hund nach ungefähr 20–30 Tagen eine vollkommene Aufhebung der Blutneubildung. Diese Versuche konnten später an einer großen Versuchsserie bestätigt werden, wobei auch der feinere Mechanismus dieser Erscheinung aufgezeigt wurde [Arnold, Hamperl, Holtz, Junkmann und Marx (7)]. Die Befunde wurden von amerikanischen Autoren an Affen nachgeprüft und im großen und ganzen bestätigt [Selye (8)]. Da entsprechende Versuche mit Diäthylstilböstrol nicht vorliegen, erschien es uns richtig, diese Lücke durch eigene Untersuchungen zu schließen.

II. Versuchsanordnung.

Männlichen und weiblichen Hunden im Alter bis zu etwa 5 Jahren wurde die zu prüfende Substanz täglich entweder intramuskulär in Sesamöl gelöst, oder peroral als Tabletten, und in einem Versuch peroral in öliger Lösung zusammen mit gehacktem Pferdefleisch verabreicht. Wir verwendeten Diäthylstilböstrol und Diäthylstilböstrol-Diacetat*. Die Nahrung der Tiere bestand aus Küchenabfällen (Kartoffeln, Fleisch, Gemüse), nach Bedarf erhielten sie Zufütterung von Pferdefleisch. Das Körpergewicht wurde laufend festgestellt. Die Versuche wurden in der Zeit von Januar bis Juli 1939 durchgeführt.

Untersuchung des Blutbildes. In bestimmten Zeitabständen wurden nach Feststellung des Ausgangsblutbildes die Zahl der roten und weißen Blutkörperchen und der Hämoglobingehalt nach Sahli bestimmt. Gleichzeitig wurden die Thrombocyten nach Fonio und die Retikulocyten mit der direkten Ausstrichmethode gezählt und die Verteilung der weißen Blutelemente festgestellt. Bei einem Tier verfolgten wir die Veränderung des Knochenmarkes durch Trepanation des Sternums in Äthernarkose. Die Zählung der Knochenmarkszellen erfolgte im Tupfpräparat, da die spongiöse Beschaffenheit des Sternalmarkes beim Hund die Anfertigung von Ausstrichpräparaten verhindert. Nach Abschluß des Versuchs wurden die Tiere, falls sie nicht spontan gestorben waren, durch Chloroforminhalation getötet und obduziert.

* Wir danken den Firmen Merck, Darmstadt, und Schering-Kahlbaum, Berlin, für die Überlassung der notwendigen Versuchsmengen von Diäthylstilböstrol.

Tabelle der durchgeführten Versuche.

Nr.	Name	Geschlecht	Körpergewicht kg	Dauer des Versuchs Tage	Tagesdosis mg	Zuführungsweise
1	Bienchen	weiblich	26,8	28	1	intramuskulär
2	Lotte	weiblich	18,2	31	4	„
3	Mohr	männlich	24,7	68	5	„
4	Bella	weiblich	18,2	34	5	„
5	Box	männlich	15,4	53	5	„
6	Spinne	weiblich	19,0	56	5	„
7	Strolch	männlich	13,2	33	10	„
8	Bienchen *	weiblich	25,4	61	10	per os (Tabl.)
9	Taras	männlich	29,0	41	15	„ „ „
10	Goliath	männlich	34,4	47	40	„ „ „
11	Amalie	weiblich	9,7	43	10	„ „ (ölige Lösung)
12	Lina	weiblich	17,3	61	1 ccm Sesamöl	intramuskulär (Kontrolle)

* Dasselbe Tier wie 1. Es wurde zu einem weiteren Versuch benutzt, da im Versuch 1 keine Wirkung aufgetreten war.

III. Eigene Befunde.

A. Wirkung auf das Blutbild.

1. Versuche mit intramuskulärer Verabreichung. Eine Wirkung auf das Blutbild wurde erst erzielt bei Injektion von täglich mindestens 4 mg Diäthylstilböstrol, und zwar ohne Rücksicht auf Geschlecht und Gewicht der Tiere. Die absolute Zahl der Leukocyten steigt erheblich an und erreicht ihr Maximum zwischen dem 7. und 25. Tag. Als höchsten Wert konnten wir 50000 im cmm feststellen. Diese Vermehrung geht ausschließlich auf die granulocytären Elemente zurück. Im Differentialblutbild ist dementsprechend eine relative Lymphopenie nachweisbar. Die Steigerung der Leukocytenzahl, welche nur bei einem Versuchstier ausblieb, entspricht also in den Grundzügen unseren Beobachtungen (7) nach übermäßiger Verabreichung von Follikelhormon. Zur Zeit der Leukocytenzunahme oder kurz danach beginnt ein gleichlaufendes Absinken der relativen und absoluten Zahlen für die Blutplättchen und Retikulocyten, das verschiedene Ausmaße annehmen kann. Verschwinden die Thrombocyten vollständig, so kommt es zu Schleimhautblutungen, besonders in der Vagina. Die Zahl der roten Blutkörperchen und der Hämoglobingehalt sinken meist einige Zeit nach dieser Hemmung der roten Blutbildung entsprechend langsam ab, wobei das Verhältnis zwischen Hämoglobin und roten Blutkörperchen (Färbeindex) im großen und ganzen gleich bleibt. Während des Ablaufes dieser Blutbildveränderungen sinkt das Körpergewicht der Tiere ab, auch war das Allgemeinbefinden gestört. Der weitere Verlauf war bei den einzelnen Tieren verschieden, wobei sich kein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen Geschlecht, Körpergewicht oder verabreichter Dosis feststellen ließ. Bei dem einen Teil der Tiere ging die beschriebene

Störung in eine vollkommene Lähmung des Knochenmarkes über. Nach dem Versagen der roten Blutbildung kommt es im Anschluß an die vorherige Steigerung der Leukocytenzahlen im strömenden Blut zu einem immer mehr fortschreitenden Absinken derselben, so daß schließlich Werte unter 1000 erreicht werden. Solche Tiere weisen dann nekrotisierende Veränderungen an ihren Schleimhäuten auf. Als Beispiel für dieses Verhalten ist der in Abb. 1 graphisch dargestellte Versuch anzusehen. Solche Tiere gehen dann spontan zugrunde. Ein anderer Teil der Tiere erholt sich trotz Fortsetzung der Injektionen auch nach einem fast vollständigen Absinken der Thrombocyten und Retikulocyten. Diese steigen wiederum auf ihre normalen Werte an unter den Zeichen einer ausgeprägten Re-

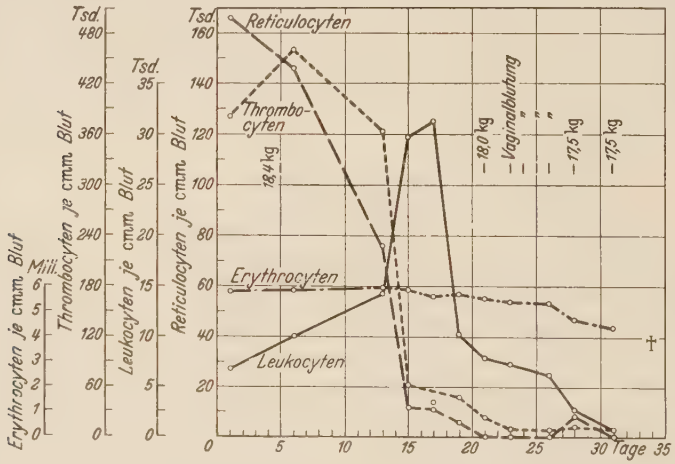


Abb. 1. Verhalten der Leukocyten, Erythrocyten, Thrombocyten und Retikulocyten bei täglicher intramuskulärer Zufuhr von 5 mg Diäthylstilböstrol. Ausgang in Knochenmarkslähmung. Hund „Bella"; 18,2 kg schwer, etwa 2—3 Jahre alt. Tod am 31. Versuchstag.

generation (Abb. 2). Allerdings war es in diesen Fällen nie zu Blutungen bzw. einem vollkommenen Fehlen der Thrombocyten gekommen. Ebenso stellen sich nach ihrem vorübergehenden Anstieg die Leukocyten wieder auf die Norm ein. Bei diesen Versuchen ist es ebenso wie bei den Versuchen mit körpereigenem Sexualhormon auffällig, daß die Thrombocytenzahlen mit den Retikulocytenzahlen im gleichen Verhältnis abfallen und bei Eintritt einer ausreichenden roten Regeneration wieder mit ansteigen. Ein solches Verhalten erlaubt gewisse Rückschlüsse auf die Entstehungsweise der Thrombocyten, deren Bildung offenbar eng mit der Erythropoese verknüpft ist. Schließlich sei noch erwähnt, daß bei einem Tier, das täglich 1 mg Diäthylstilböstrol erhielt, keine der beschriebenen Veränderungen des Blutbildes zu beobachten waren (Versuch 1, „Bienchen"). Auch in Kontrollversuchen und anläßlich anderer Untersuchungen konnten wir uns davon überzeugen, daß das Lösungsmittel (Sesamöl) sie allein für sich nicht hervor-

zurufen vermag. Betont muß noch werden, daß in der Wirkungsweise des Diäthylstilböstrol und seines Essigsäureesters kein Unterschied festzustellen war.

2. Perorale Verabreichung. Bei Hunden, die 10 und 15 mg Diäthylstilböstrolacetat peroral erhielten, war die oben beschriebene Veränderung des Blutbildes nicht festzustellen. Das Körpergewicht blieb konstant oder nahm sogar zu. Nur bei einem Tier, das 40 mg erhielt, war eine Reaktion nachweisbar: es kam zu einem Anstieg der Leukocyten, zum Absinken der Thrombocyten und Retikulocyten; Blutungen fehlten. Die Störung glich sich aber trotz weiterer Verabreichung, ganz so wie es oben

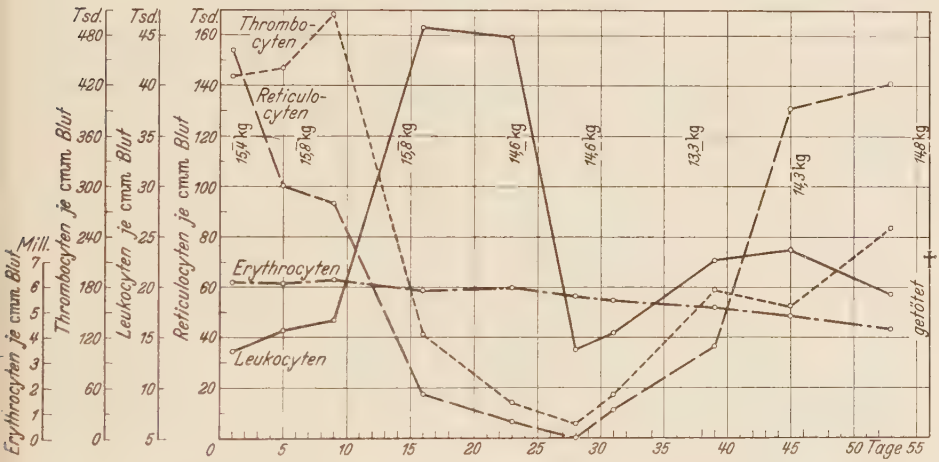


Abb. 2. Verhalten der Leukocyten, Erythrocyten, Thrombocyten und Retikulocyten bei täglicher intramuskulärer Zufuhr von 5 mg Diäthylstilböstrol. Erholung nach vorübergehender Schädigung. Männlicher Hund, „Box“: 15,4 kg schwer, etwa 3–4 Jahre alt. Tötung zur Sektion durch Chloroforminhalation.

beschrieben wurde, wiederum aus. Während des Auftretens und Abklingens der Blutveränderungen war bei diesem Tier eine hochgradige Steigerung des Speichelflusses zu beobachten. Soweit es sich nach diesem einzigen Versuch beurteilen läßt, scheint also zur Erzielung einer Wirkung auf das Blutbild bei peroraler Verabreichung ungefähr das 10fache der intramuskulär angewandten Dosis notwendig zu sein.

B. Organveränderungen.

Unsere Aufmerksamkeit war in erster Linie auf diejenigen Organe gerichtet, in denen Grumbrecht und Loeser bei ihren Versuchen Veränderungen festgestellt haben.

1. In der Leber konnten wir nur ein einziges Mal Verfettung und Bildung von Gallezylindern (Ikterus) feststellen, und zwar bei einem

Hund, der 5 mg intramuskulär erhalten und sich von seinen Blutveränderungen nicht mehr erholt hatte. Bei einem zweiten Tier, das die Blutveränderung überstanden hatte, waren Gallezylinder, aber keine Verfettungen nachweisbar. Nekrosen in der Leber ließen sich niemals auffinden. Bei keinem unserer Tiere konnten wir eine Bilirubinvermehrung im Serum feststellen (indirekte Methode).

2. In den Tubuli contorti der Niere fanden sich bei 2 Tieren, die aber keine Zeichen von Ikterus in der Leber aufwiesen, gelbbräunliche körnige Pigmenteinschlüsse, welche wahrscheinlich Bilirubin darstellten. Bei einigen Tieren wurde der Harn auf Gallenfarbstoff untersucht, eine Gesetzmäßigkeit ließ sich nicht nachweisen.

3. An der Schilddrüse war ebenfalls kein gesetzmäßiges Verhalten festzustellen. Bei Tieren mit den schwersten, sich nicht ausgleichenden Blutveränderungen fanden sich das eine Mal sehr kolloidreiche Follikel mit niedrigem Epithel (Ruhestellung der Schilddrüse), das andere Mal hohe Epithelzellen und wenig Kolloid.

4. Die deutlichste Abhängigkeit von der Zufuhr des Diäthylstilböstrols zeigt die Prostata, und zwar ohne Rücksicht auf die Art der Einverleibung. Eine Abhängigkeit bestand nur hinsichtlich der Versuchsdauer: Nach 33 Tagen waren bloß die Drüsen am Colliculus seminalis und die paraurethralen Drüsen von Plattenepithelmassen ausgefüllt, während der übrige Drüsenkörper normale Verhältnisse zeigte; nach 41 Tagen waren aber auch in ihm bereits kleine Plattenepithelherde hier und dort verstreut aufgetreten; nach 50 Tagen sind so gut wie alle Drüsenräume von Plattenepithelmassen ausgefüllt. Bemerkenswerterweise waren diese Veränderungen in der Prostata auch dann vorhanden, wenn nach peroraler Zufuhr von 15 mg Diäthylstilböstrol keine Blutveränderungen aufgetreten waren. Die Prostata scheint also diesbezüglich empfindlicher zu sein als das Blutbild.

5. In den Hoden war bei den männlichen Tieren die Spermiogenese völlig erloschen, und zwar in Analogie zu den Veränderungen in der Prostata auch bei einem Tier, das nur 15 mg peroral erhalten und keine Veränderungen des Blutbildes aufgewiesen hatte.

6. Das Knochenmark zeigte bei den Tieren, die sich nach der Blutveränderung wieder erholt hatten, wie zu erwarten war, die Zeichen einer ausgiebigen Neubildung von weißen und roten Blutkörperchen; doch war es nie zu einer umfangreicheren Umwandlung des Markes in der Femurdiaphyse gekommen. Im übrigen zeigte das Knochenmark Veränderungen, die ganz denen des Blutbildes entsprachen. Regenerationserscheinungen waren hier schon sehr früh (während des Leukocytenanstieges) zu beobachten.

7. Keine irgendwie gesetzmäßigen und über die Schwankungsbreite des normalen Verhaltens hinausgehenden Befunde wiesen auf Hypophyse, Nebenniere, Milz und Herz. Die Ovarien zeigten in reichlichem Maße reifende Follikel.

IV. Besprechung.

Die hier dargelegten Befunde stimmen also im großen und ganzen mit den von uns früher an Hunden erhobenen überein, welche mit großen Mengen von Follikelhormon behandelt worden waren. Bemerkenswert ist nur der Umstand, daß die Blutveränderungen nach Verabreichung von Diäthylstilböstrol doch in vielen Fällen wiederum vollkommen ausgeglichen werden. Die Wirkung des künstlichen Brunststoffes Stilböstrol auf die Blutbildung scheint beim Hund also schwächer zu sein als die von gleichen Gewichtsmengen des körpereigenen weiblichen Sexualhormons. Ähnliche Beobachtungen machten Selye und Masson (8) bei vergleichenden Versuchen mit Diäthylstilböstrol und körpereigenen östrogenen Stoffen. Diese Untersucher konnten auch beobachten, daß sich Affen bei Zuführung sowohl von körpereigenem Sexualhormon wie von Diäthylstilböstrol trotz Fortführung der Behandlung wieder spontan erholten.

Unsere Versuche lassen gerade im Hinblick auf die von Grumbrecht und Loeser an Ratten erhobenen Befunde eine Tatsache sinnfällig werden: Jede Tierart antwortet in einer ihr eigenen Weise auf die übermäßige Zufuhr sowohl der natürlichen wie der künstlichen Brunststoffe. Dabei ist z. B. beim Hunde die Ähnlichkeit zwischen den Reaktionen auf den natürlichen und künstlichen Brunststoff größer als die Ähnlichkeit zwischen der Reaktion auf den künstlichen Brunststoff bei Hund und Ratte. Die Tatsache des verschiedenen Verhaltens der einzelnen Tierarten geht übrigens schon aus einer Feststellung von Grumbrecht und Loeser hervor, die bei Meerschweinchen auch nach lange dauernder übermäßiger peroraler Zufuhr von Diäthylstilböstrol in der Leber diejenigen toxischen Veränderungen vermißten, die sie bei der Ratte gefunden hatten. Bei dieser Sachlage werden wir doppelte Vorsicht walten lassen müssen, wenn es sich um die Reaktionen des Menschen auf künstliche Brunststoffe handelt. Es wäre ein schwerer Fehler, wollte man den Menschen ohne weiteres einer der so verschieden sich verhaltenden Tierarten gleichsetzen. Dazu genügen die bis jetzt vorliegenden spärlichen Angaben keineswegs.

V. Zusammenfassung.

Untersucht wurde die Wirkung einer übermäßigen Zufuhr des synthetischen Brunststoffes Diäthylstilböstrol an Hunden. Sie gleicht weitgehend der einer übermäßigen Zufuhr des natürlichen weiblichen Sexualhormons (Östradiol), doch ist die Wirkung auf das Blutbild schwächer. Auf das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Tierarten wird hingewiesen.

Literatur.

1) Dodds u. Lawson: Nature (Brit.) **139**, 627—1068 (1937); Dodds, Fitzgerald u. Lawson: Ebenda **240**, 772 (1937); Dodds, Goldber, Lawson u. Robinson: Ebenda **141**, 247 (1938); **142**, 211 (1938); Dodds, Lawson u. Noble: Lancet **234**, 1399 (1938). — 2) Loeser, A.: Klin. Wschr. **1939**, S. 346; Z. exper. Med. **105**, 430 (1939). — 3) Kreitmair u. Sieckmann: Klin. Wschr. **1939**, S. 156. — 4) Grabe: Münch. med. Wschr. **1939**, S. 436. — 5) Guldberg: Zbl. Gynäk. **47**, 2584 (1938); Buschbeck u. Hausknecht: Klin. Wschr. **1939**, S. 160; Engelhart: Wiener klin. Wschr. **1938**, S. 1356; Loeser: Brit. med. J. **4070**, 13 (1939); Winterton u. Mac Gregor: Ebenda **4070**, 10 (1939); 6) Arnold, Holtz u. Marx: Naturw. **20**, 314 (1936). — 7) Arnold, Hamperl, Holtz, Junkmannu. Marx: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **186**, 1 (1937). — 8) Selye, H., u. G. Masson: persönliche Mitteilung. — 9) Lacassagne: C. r. Soc. Biol. **129**, 641 (1938). — 10) Loeser u. Grumbrecht: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 345 (1938); **192**, 202 (1939); **193**, 34 (1939).

(Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.-G., Berlin.)

Der Follikelhormongehalt der Progynondragées.

Eine Erklärung zur Arbeit von W. Koll und F. Külz in Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, H. 5/6, S. 506.

Von

Walter Hohlweg.

(Eingegangen am 4. Dezember 1939.)

In der im Titel zitierten Arbeit von Koll und Külz wird auf Grund der Testierung von Extrakten aus Progynondragées mitgeteilt, daß die untersuchten Dragées nur 30 bzw. 60% der angegebenen Einheiten enthielten, und daß dies „kaum anders zu deuten sei, als durch einen Mangel an wirksamer Substanz". Diese Deutung steht eigentlich im Widerspruch zu einer Feststellung, die in einer früheren Arbeit von Behrens, Heubner, Koll und Külz [1] enthalten ist. Auf S. 152 heißt es dort sogar fett gedruckt: „So stellen wir fest, daß die Auswertung von Oestronpräparaten an Maus oder Ratte zu erheblich verschiedenen Ergebnissen führen kann, trotz der Anwendung eines Standardpräparats!"

Auf die Tatsache, daß es unmöglich sei, bei der Testierung von Präparaten, die außer Oestron andere oestrogene Wirkstoffe (Oestriol, Oestradiol) enthalten, übereinstimmende internationale Einheiten zu erhalten, wenn sie an verschiedenem Tiermaterial (Ratte und Maus) mit dem internationalen Standard verglichen werden, haben zuerst Schoeller, Dohrn und Hohlweg in einer Arbeit in der Klin. Wschr. 1935, S. 826 aufmerksam gemacht. In bester Übereinstimmung damit hat später Kay Pedersen Bjergaard (Comparative studies concerning the strengths of oestrogenic substances, Einar Munksgaard, Kopenhagen 1939) in einer sehr genauen und ausführlichen Arbeit diese Erkenntnisse bestätigt und erweitert. Leider haben Koll und Külz diese Arbeiten scheinbar nicht genügend gekannt und bei der Deutung ihrer Versuchsergebnisse einen Fehler begangen, der auf Grund der vorne zitierten Feststellung aus der Arbeit von Behrens und Heubner, an der Koll und Külz ja als Mitarbeiter beteiligt waren, schwer verständlich ist.

Welches ist nun die richtige Deutung der Auswertungsdifferenzen, die sich bei der Testierung der Progynondragées an der Maus durch Koll und Külz ergeben haben? Als der internationale Follikelhormonstandard in Form des reinen Oestrons geschaffen wurde, sprach man eigentlich immer nur von dem Follikelhormon und meinte damit das Oestron. In unserem Laboratorium wurde zuerst das Oestradiol dargestellt und dessen

[1] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **186**, 121 (1937). — [2] Ebenda **191**, 340 (1939).

höhere Wirksamkeit erkannt, was von vielen Nachprüfern, z. B. auch von Koll und Nocken[2], bestätigt wurde. Nach unseren Untersuchungen ist Oestradiol an Ratten, Kaninchen und Affen bis zu achtmal so wirksam wie Oestron. Auch beim Menschen stellte Kaufmann in seinen klassischen klinischen Untersuchungen an der kastrierten Frau eine entsprechende höhere Wirksamkeit des Oestradiols gegenüber Oestron fest. Bei der Maus jedoch ist Oestradiol, je nach der Testierungsart, nicht oder nur in einem geringeren Grad wirksamer als Oestron!

Da nach der internationalen Standardisierungsvorschrift Ratte oder Maus als Testtiere benutzt werden können und Oestron als Vergleichsstandard dient, müssen Auswertungen von Präparaten, die Oestradiol enthalten, an der Maus niedrigere internationale Einheiten ergeben als an der Ratte. Die Progynondragées enthalten nun nicht nur Oestron, sondern ein Rohkristallisat, welches auch Oestradiol und Oestriol enthält, da sich diese Mischung klinisch sehr bewährt hat. An der Ratte testiert ergeben diese Dragées genau die angegebenen Einheiten, wie durch das folgende Auswertungsbeispiel gezeigt werden soll:

3 Progynondragées zu 1000 i. E. werden feinstens gepulvert und in 324 ccm Wasser emulgiert. Von der Emulsion A wird durch Verdünnung im Verhältnis 3 + 1 die Emulsion B hergestellt. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen werden früh, mittags und abends je 0,2 ccm davon kastrierten Rattenweibchen subcutan verabreicht. Um Ungenauigkeiten durch Absetzen der Emulsionen zu verhindern, werden für jede Injektionsserie neue Emulsionen hergestellt. Die weiteren Daten der Auswertung sind aus der Tabelle 1 zu ersehen:

Tabelle 1. Progynon-Dragées zu 1000 i. E.

Verdünnung	Dosis	Anzahl der Ratten	Davon positiv
3 Dragée in 324 ccm Wasser = Emulsion A	6 × 0,2 ccm = 1/90 Dragée (90 RE. pro Dragée)	**22**	**15**
Emulsion A 3 + 1 verdünnt = Emulsion B	6 × 0,2 ccm = 1/120 Dragée (120 RE. pro Dragée)	22	7

Gleichzeitig wurde das internationale Oestronstandardpräparat ausgewertet. Die Auswertungstechnik wurde vorschriftsmäßig in genau derselben Weise vorgenommen wie bei den Dragées. In der Tabelle 2 sind die Resultate enthalten.

Aus den beiden Tabellen geht hervor, daß erstens 1 Dragée 90 RE. enthält, und daß zweitens eine dieser RE. 1,2 γ Oestron oder 12 i. E. entspricht. Ein Dragée enthält demnach 90 × 12 = 1080 i. E.!

Wenn ein anderer Untersucher an der in der internationalen Standardisierungsvorschrift an zweiter Stelle genannten Maus die Auswertung

Tabelle 2. Oestronstandard.

Verdünnung	Dosis	Anzahl der Ratten	Davon positiv
430 γ in 344 ccm Wasser = Lösung A	6 × 0,2 ccm = 1,5 γ	10	7
Lösung A 4 + 1 verdünnt = Lösung B	6 × 0,2 ccm = 1,2 γ	10	6
Lösung A 2 + 1 verdünnt = Lösung C	6 × 0,2 ccm = 1,0 γ	10	2
Lösung B 2 + 1 verdünnt = Lösung D	6 × 0,2 ccm = 0,8 γ	10	2

vornimmt und ein abweichendes Resultat findet, so ist das kein Beweis dafür, daß die Dragées nicht die richtige Hormonmenge enthalten, sondern nur ein Beweis der Unzulänglichkeit der bisherigen Bestimmungen über die internationale Oestruseinheit.

Nachdem durch Schering das dem Oestron klinisch weit überlegene Oestradiolbenzoat (Progynon B) in die Therapie eingeführt worden war, wurde dieses Präparat selbst von der internationalen Standardisierungskommission als neuer Standard festgesetzt. Es dürfen jedoch mit dem neuen Standard nur veresterte Präparate verglichen werden und nicht freies Oestradiol.

Koll und Külz sind weiterhin erstaunt darüber, daß Schering früher ME. einer öligen Hormonlösung mit einem anderen Faktor in i. E. umgerechnet hat als ME. einer wässerigen Hormonlösung. Die Autoren haben scheinbar bei ihren Untersuchungen noch nicht die Erfahrung gemacht, daß dasselbe Produkt bei Auswertung in öliger bzw. wässeriger Lösung verschiedene Resultate ergibt. Es würde zu weit führen, auch diesen Punkt noch eingehend zu erörtern, da letzteres ohnehin in den schon zitierten Arbeiten von Schoeller und Mitarbeitern und Pedersen Bjergaard ausführlich und klar verständlich geschehen ist.

Zusammenfassung.

Es wird festgestellt, daß ein von Koll und Külz durch Auswertung von Extrakten aus Progynondragées an Mäusen nachgewiesener angeblicher Mangel dieser Dragées an internationalen Einheiten nicht auf einem Mangel an wirksamer Substanz beruht, sondern auf der Verwendung der Maus als Testtier. Im Gegensatz zu den anderen Versuchstieren (Ratte, Kaninchen, Affe) und zum Menschen zeigt die Maus, verglichen zu ihrer Ansprechbarkeit auf Oestron, eine relativ geringe Reaktionsfähigkeit gegenüber Oestradiol.

Berichtigung

zu der Arbeit „Über Auswertung von oestronhaltigen Tablettenpräparaten“ (Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 521 (1939)].

Von

W. Heubner.

Zu meinem Bedauern ist auf S. 529 ein Druckfehler stehengeblieben, der an dieser Stelle sinnstörend wirkt, wenn auch der Fehler aus den vorhergehenden Angaben erkannt werden kann (vgl. Tabelle 7 auf S. 526): unser Berliner Ergebnis für Perlatan auf Tabelle 10 war nicht 0,98, sondern richtig **0,89**.

Aus der Chirurgischen Universitäts-Klinik Tübingen.
(Direktor: Prof. Dr. W. Usadel.)

Die Bestimmung des Prontosil solubile im Vollblut und Blutplasma nach seiner Isolierung mittels der chromatographischen Adsorptionsanalyse.

Von
Dr. S. Stelzer.

Mit 17 zum Teil farbigen Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. September 1939.)

Welche Bedeutung der Chemotherapie der Infektionskrankheiten zukommt, zeigen die Erfolge, die bei der Behandlung der Lues mit Salvarsan, der Malaria mit Plasmochin und Atebrin, der Schlafkrankheit mit Germanin, der Bilharzia- und Kala-Azar-Krankheit mit Antimonverbindungen erreicht worden sind. Die chemische Behandlung der Streptokokken- und Staphylokokkeninfektion war jedoch bis vor einigen Jahren noch recht wenig befriedigend, so daß die verschiedenen, früher zur Unterstützung der chirurgischen Behandlung solcher Infektionen benutzten Mittel wie Silber-, Gold- und Farbstoffpräparate, artfremde Eiweißkörper, Serum und Vakzine fast ganz außer Gebrauch gekommen sind. In der jüngsten Zeit aber hat nun das Prontosil im Kampfe gegen die bakteriellen Infektionen größte Beachtung gefunden. Die mit Prontosil bei der Behandlung des Erysipels, der Meningitiden, Cystitiden und Pyelitiden gemachten Erfahrungen sprechen für eine günstige therapeutische Wirkung dieses Präparates (1, 2). Über die heilende Beeinflussung schwerer pyogener bakterieller und toxischer Allgemeininfektionen mittels Prontosils sind die Beobachtungen nicht einheitlich und die Meinungen geteilt. Die Behandlung örtlicher Staphylokokken- und Streptokokkeninfektionen mit Prontosil brachte Erfolge und Mißerfolge. Hier herrscht in der Beurteilung, ob dem Prontosil nun wirklich bei der Behandlung dieses oder jenes Falles eine Heilwirkung zuzuschreiben ist, große Unsicherheit. Auch die Frage der für eine Heilung günstigsten Prontosilkonzentration im Blute ist noch nicht geklärt. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine Gesetzmäßigkeit zwischen der Höhe des Prontosilspiegels im Blute und einem Heilerfolg oder mißerfolg besteht. Da bei verschieden großen Gaben von Prontosil bei den einzelnen Kranken wegen der starken und ungleichmäßigen Verdünnung im Blute sehr feine Schwankungen der Farbstoffkonzentration zu erwarten waren, mußte eine Bestimmungsmethode ausgearbeitet werden, die gewisse Fehlerquellen der bisher angewendeten Methode (3) möglichst vollkommen beseitigt und genaue, im Modellversuch reproduzierbare Werte liefert. Ferner schien

es von Bedeutung, der klinisch-chemischen Untersuchungsmethodik neue Wege zur quantitativen Erfassung geringer Konzentrationsänderungen von therapeutisch oder zu anderen Zwecken benutzten Farbstoffen in kleinen Mengen Körperflüssigkeit zu erschließen. In dieser Arbeit soll daher über quantitative Untersuchungen des Prontosil solubile in wässeriger Lösung, im Vollblut und Plasma unter Benutzung der Adsorptionsmethode berichtet werden. Die beiden anderen Mittel der Prontosilgruppe, Prontosil (Base) und Prontosil album, wurden in die quantitativen Arbeiten nicht einbezogen. Die vorgesehenen klinischen Untersuchungen sind einer späteren Veröffentlichung vorbehalten.

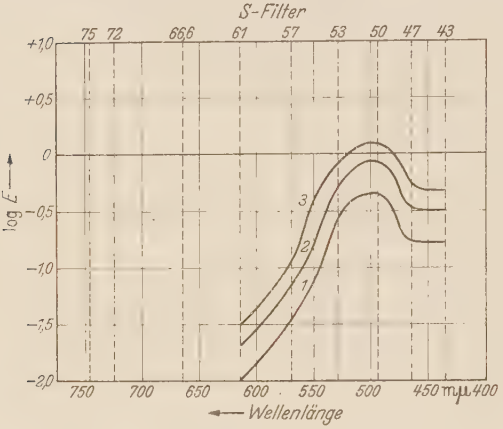


Abb. 1. „Typische Farbkurven" wässeriger Prontosil sol.-Lösungen.

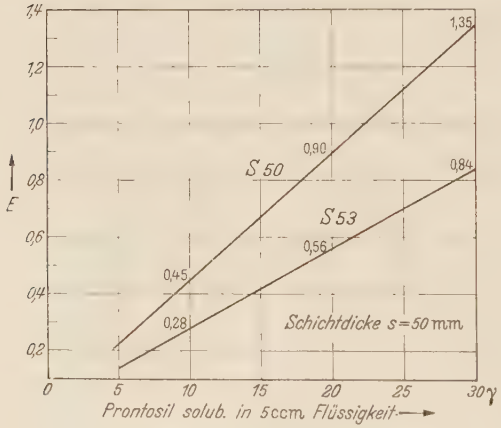


Abb. 2. Extinktion und Prontosil sol.-Konzentration.

Alle Messungen von Lösungen des Prontosil solubile (Pr. S.) wurden mit dem Pulfrich-Photometer durchgeführt. Zur Kennzeichnung der Absorptionseigenschaften einer wässerigen Pr. S.-Lösung wurden Farbstofflösungen mit einem Gehalt von 10, 20 und 30 γ (Abb. 1, Kurve 1, 2, 3) in 5 ccm Lösung mittels verschiedener Spektralfilter bei einer Schichtdicke von 5 cm (Mikroküvette) gegen Wasser gemessen und die Logarithmen der gefundenen Extinktionswerte (E) in Abhängigkeit von der Wellenlänge in ein Koordinatensystem eingetragen. Die so gewonnenen, sogenannten „typischen Farbkurven" charakterisieren einen in Lösung befindlichen Farbstoff durch ihre für ihn ganz „typische" Form in eindeutiger Weise. Die Kurven zeigen ein Absorptionsmaximum im Wellenbereich des Spektralfilters S 50, und im langwelligen Gebiet des Spektrums sinkt die Absorption steil ab. Wichtig ist der parallele Verlauf der einzelnen Kurven, der darauf hindeutet, daß das Lambert-Beersche Absorptionsgesetz von den Farbstofflösungen erfüllt wird, welches fordert, daß die Extinktion mit steigender Konzentration des Farbstoffs proportional zunimmt.

Auf dem Kurvenblatt der Abb. 2 sind auf der Abszisse sechs verschiedene Farbstoffmengen in 5 ccm Lösung in Abhängigkeit von den auf der Ordinate aufgetragenen Extinktionswerten aufgezeichnet. Die Messung geschah bei einer Schichtdicke von 5 cm mit den Filtern S 50 und S 53. Dabei ergaben sich zwei durch den Nullpunkt verlaufende gerade Linien, ein weiterer Beweis dafür, daß das Lambert-Beersche Gesetz für die Pr. S.-Lösungen Gültigkeit hat: Die Extinktion ist direkt proportional der Konzentration des in Lösung befindlichen Farbstoffs.

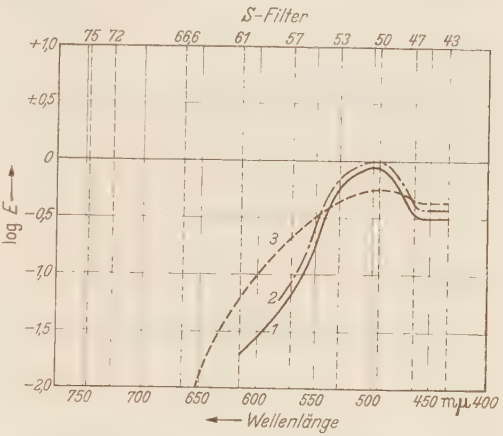


Abb. 3. Die Abhängigkeit der typischen Farbkurven wässeriger Prontosil sol.-Lösungen vom Milieu.

Durch weitere Messungen einer wässerigen, einer n/10 HCl-sauren, n/10 NaOH-alkalischen, n/10 NaOH-alkalischen und mit 0,5 n HCl wieder angesäuerten und nur mit 0,5 n HCl versetzten Pr. S.-Lösung mit einer Konzentration von 20 γ in 5 ccm Flüssigkeit erhielt man die in der Abb. 3 wiedergegebenen Kurven.

Auch diese „typischen Farbkurven", deren Messung mit allen Spektralfiltern bei einer Schichtdicke von 5 cm gegen das entsprechende Lösungsmittel erfolgte, weisen ihr Absorptionsmaximum bei dem Spektralfilter S 50 auf, um im langwelligen Anteil des Spektrums mit ihrer Absorption schnell abzufallen. Die Kurve der n/10 HCl-sauren Lösung (Kurve 1) deckt sich völlig mit derjenigen der wässerigen Pr. S.-Lösung (Kurve 1). Während gegenüber diesen Kurven diejenigen der alkalischen und wieder mit 0,5 n HCl (Kurve 2) und der nur mit 0,5 n HCl angesäuerten Pr. S.-Lösung (Kurve 2) eine Parallelverschiebung erfahren haben, sonst aber die gleiche Gestalt besitzen, ist die Form der Kurve der alkalischen Pr. S.-Lösung (Kurve 3) völlig verändert. Das Maximum der alkalischen Lösung liegt tiefer, das der alkalischen und wieder angesäuerten und das der nur mit

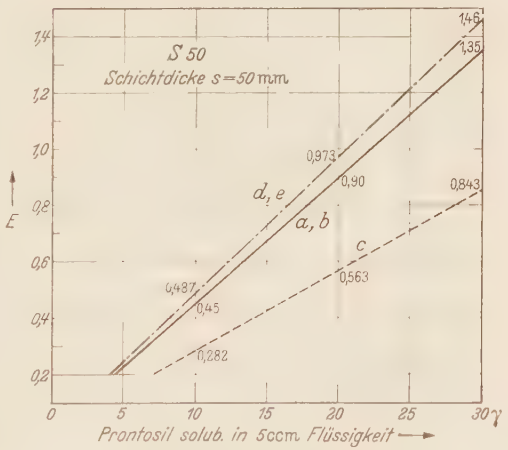


Abb. 4. Extinktion und Prontosil sol.-Konzentration bei verschiedenem Milieu.

0,5 n HCl angesäuerten Lösung höher als dasjenige der wässerigen und der n/10 HCl-sauren Pr. S.-Lösung.

Daß jede dieser einzelnen Lösungen dem Lambert-Beerschen Gesetz folgt, geht aus dem Diagramm der Abb. 4 hervor.

Die Extinktion steigt bei allen 5 Lösungen proportional der Konzentrationszunahme des Farbstoffs. Die durch den Nullpunkt gehenden Geraden unterscheiden sich voneinander nur dadurch, daß sie mit der Ordinate verschieden große Winkel bilden. Die Extinktionswerte der dunkelroten alkalischen Lösung (Kurve *c*) sind um rund 37,5 % kleiner, diejenigen der alkalischen und wieder angesäuerten und der nur stark angesäuerten Lösung (Kurve *d* bzw. *e*) liegen um 8,1 % höher als die *E*-Werte der hellroten wässerigen und n/10 HCl-sauren Pr. S.-Lösung (Kurve *a* bzw. *b*). Deshalb empfiehlt sich eine Messung des Farbstoffs in saurer Lösung, weil durch die gesteigerte Lichtabsorption eine genauere Ablesung gewährleistet wird.

So einfach und exakt man die Messung wässeriger n/10 und 0,5 n HCl-saurer, n/10 NaOH-alkalischer, n/10 NaOH-alkalischer und mit 0,5 n HCl angesäuerter Pr. S.-Lösungen durchführen konnte, so schwierig war es, in Modellversuchen befriedigende und übereinstimmende Werte von Pr. S.-haltigen Seren zu bekommen. Wurde einem Serum eine bestimmte Menge Pr. S. zugesetzt, dann mit Wasser verdünnt und gemessen, so waren die erhaltenen Werte völlig unzureichend.

0,5 ccm von verschiedenen Kranken gewonnenen Serums wurden 5 γ Pr. S. zugefügt, mit Wasser auf 5 ccm aufgefüllt und gegen eine entsprechende Pr. S.-freie Kompensationsflüssigkeit bei einer Schichtdicke von 5 cm mit dem Filter S 50 gemessen. Einige der erhaltenen Werte sind in der Tabelle 1 niedergelegt.

Wie zu erwarten, führen die Messungen des Nüchternserums mit Pr. S.-Zusatz nicht nur bei den einzelnen Kranken zu verschiedenen Werten, sondern weichen sogar bei ein und demselben Kranken (Leistenbruch) stark voneinander ab. Die Werte fallen einmal zu hoch, ein andermal zu niedrig aus. Einen großen Einfluß auf die Meßergebnisse hat der jeweilige Zustand des Kranken: Operation, Nahrungsaufnahme, Flüssigkeitszufuhr und längeres Dürsten. Ein einziger Wert entspricht der dem Serum zugesetzten Pr. S.-Menge. Diese Zahl ist aber als ein Zufallstreffer zu betrachten.

Hier lagen also eine Menge Störungen vor, die sich in besonders großem Maße bei kleinen Pr. S.-Mengen auszuwirken schienen.

Das indikatorähnliche Verhalten des Pr. S. ließ daran denken, daß die Wasserstoffionenkonzentration des Serums an den falschen Meßergebnissen beteiligt sei. Deshalb wurden zwei Pr. S.-Lösungen (*A*: 250 γ Pr. S. in 15 ccm; *B*: 12,5 γ in 11 ccm) mit Glykokollpuffer auf ein verschiedenes p_H gebracht und photometriert. Auf dem Kurvenblatt der Abb. 5 sind auf der Ordinate die Werte für die Extinktion, auf der Abszisse diejenigen für das p_H aufgetragen. Aus dem Diagramm geht hervor, daß die Extinktionskurven

Tabelle 1. Unzulänglichkeit der Prontosil sol.-Messung im Serum.

Krankheit	Anstatt $E = 0{,}225$ entsprechend 5 γ Pr. S. gefunden E	Bemerkungen
Stichverletzung	− 0,061	Nüchtern
	0,300	2 Std. nach Mittagessen
Ulcus ventr.	0,270	Nüchtern
	0,189	3 Std. nach Operation
Oberschenkelsarkom	0,460	Nüchtern
	0,110	3 Std. nach Operation
Leistenbruch	0,225	Nüchtern
	0,132	1 Std. nach Wasserstoß
	0,280	5 „ „ „
Leistenbruch	0,239	Nüchtern
	0,148	Nach 5stündigem Dürsten

der gemessenen Pr. S.-Lösungen in einem p_H-Bereich von 6 bis ungefähr 10 konstant waagerecht verlaufen, dann nach der alkalischen Seite bis ungefähr zu einem p_H von 12,5 stark und darüber hinaus fast nicht mehr absinken. Vom Beginn bis zum Ende der Kurven ist eine Verminderung der Extinktion von etwa 40 % festzustellen. Da die nur geringen Schwankungen unterliegenden p_H-Werte des Serums in den waagerechten Teil der Kurven fallen, wo also die Extinktionswerte der Pr. S.-Lösungen gleich groß sind, war eine durch das p_H bedingte, zu falschen Ergebnissen führende Beeinflussung der Messungen Pr. S.-haltigen Serums nicht wahrscheinlich.

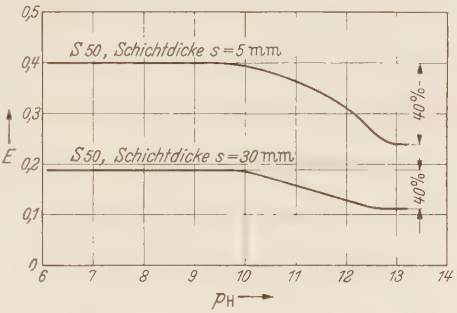


Abb. 5. Extinktion zweier Prontosil sol.-Lösungen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

Um die Ursachen für die äußerst wechselnden Extinktionswerte der Pr. S.-haltigen Seren aufzuklären, mußte man sich ein Bild von den Absorptionseigenschaften eines mit Pr. S. versetzten und unverdünnten, verdünnten, sauren, alkalischen und mit verschiedenen Mitteln enteiweißten Serums verschaffen, worüber die in Abb. 6 und 7 dargestellten typischen Farbkurven Aufschluß geben.

Die typischen Farbkurven der Abb. 6 wurden so gewonnen, daß $^1/_2$ ccm wässeriger Pr. S.-Lösung = 20 γ mit Serum (Kurve 3), dann 20 γ Pr. S. + 1 ccm Serum mit destilliertem Wasser (Kurve 1), n/10 HCl und n/10 NaOH (Kurven 2 bzw. 4) auf 5 ccm aufgefüllt und bei einer Schichtdicke von 5 cm mit allen Spektralfiltern gegen entsprechende Kompensationslösungen gemessen wurden. In ähnlicher Weise wurden die in Abb. 7 wiedergegebenen Kurven erhalten. 1 ccm Serum + $^1/_2$ ccm wässe-

riger Pr. S.-Lösung = 20 γ wurde mit Alkohol, mit 10%iger Trichloressigsäure, mit Natriumwolframatlösung nach Folin und mit verdünnter Salzsäure (Kurven 3 bzw. 1, 2 und 4) bis zu einem Volumen von 5 ccm versetzt und nach Abschleudern des ausgefällten Eiweißes photometriert. Die Form der abgebildeten Kurven ist ganz verschieden von der typischen Farbkurve einer wässerigen Pr. S.-Lösung, wie ein Vergleich mit den früher beschriebenen Kurven (siehe Abb. 1 u. 3) zeigt. Auch untereinander weicht die Gestalt der vor und nach Enteiweißung angefertigten Kurven erheblich voneinander ab. Das Absorptionsmaximum liegt zwar bei allen Kurven im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums, die Extinktionswerte sind aber verschieden groß. Die im kurzwelligen Gebiete des Spektrums verlaufenden Kurvenstrecken haben nach der Enteiweißung des Serums etwas mehr Ähnlichkeit mit den typischen Farbkurven einer wässerigen oder n/10 HCl-sauren Pr. S.-Lösung als die vom nicht enteiweißten Serum herrührenden. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß im langwelligen Spektralgebiet die Kompensationsflüssigkeit des alkalischen, wässerigen und unverdünnten und des mit Alkohol und mit verdünnter Salzsäure enteiweißten Serums eine größere Lichtabsorption zeigt als das Pr. S.-

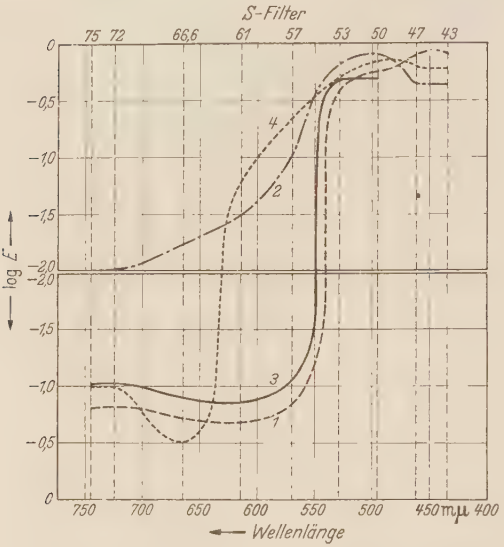


Abb. 6. Typische Farbkurven Prontosil sol.-haltigen Serums unter verschiedenen Bedingungen.

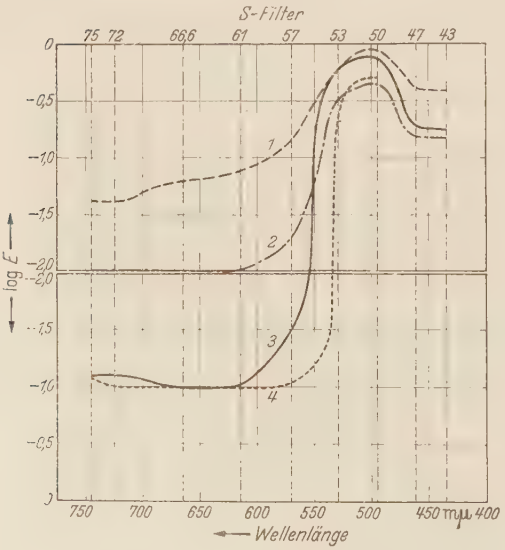


Abb. 7. Typische Farbkurven Prontosil sol.-haltigen Serums nach der Enteiweißung.

haltige Serum. Dieser Befund ist in den Abb. 6 und 7 dadurch angedeutet, daß die Kurvendiagramme in der Mitte waagerecht geteilt und

unterhalb von dem Doppelstrich die Extinktionswerte der Kompensationsflüssigkeit aufgezeichnet wurden.

Fraglos spielt für das regellose Verhalten der erläuterten Kurven die gelbliche Eigenfarbe des Serums eine gewisse Rolle, die sich aus Lipochromen beim Diabeteskranken besonders reichhaltig - , aus Gallenfarbstoff, manchmal aus Spuren Hämoglobin und seinen Derivaten zusammensetzt, die aber zum Teil durch Enteiweißung entfernt wird, worauf das Absinken der Absorption im kurzwelligen Spektralgebiet in Abb. 7 hinweist. Eine größere Bedeutung für die unzulänglichen Meßergebnisse kommt aber den Serumkolloiden Fibrinogen, Serumglobulin und Serumalbumin zu. Meistens besitzen die Serumlösungen eine deutliche Opaleszenz, durch welche die Messung beträchtlich erschwert wird. Außerdem bemerkt man manchmal schon bei der Betrachtung einer genügend verdünnten Pr. S.-haltigen Serumlösung im Tageslicht einen geringen Unterschied ihres Farbtons gegenüber einer wässerigen Pr. S.-Lösung. Das Pr. S.-Serum ist mehr oder weniger violettstichig. Selbst bei einer 10- bis 20fachen Verdünnung des Pr. S.-haltigen Serums ändert sich die Form dieser typischen Farbkurven kaum. Ganz gleich, ob die Pr. S.-Serumlösung wässerig, sauer oder alkalisch ist, ihre typischen Farbkurven stimmen mit derjenigen einer wässerigen Lösung nicht überein. In jedem Falle muß also die Anwesenheit der Serumkolloide als hauptsächlichster Störungsgrund betrachtet werden. Darauf deutet auch die Beobachtung hin, daß eine Pr. S.-haltige Serumlösung durch Lauge nicht den sehr deutlichen Farbumschlag nach Dunkelrot erleidet wie eine wässerige, alkalisch gemachte Pr. S.-Lösung. Deshalb muß das Pr. S. mit den Kolloiden eines wässerigen, sauren oder alkalischen Serums eine Bindung eingegangen sein, die aber wohl keine echte chemische Bindung darstellt, sondern nur eine Anlagerung des Farbstoffs durch einfache Adsorption, wofür vor allem die weiter unten beschriebene, auf physikalisch-chemische Weise durchgeführte Trennung des Pr. S. von den Kolloiden sprechen dürfte. Die aus der Tabelle 1 ersichtliche Unstimmigkeit zwischen E-Werten für dieselbe Pr. S.-Menge in verschiedenen Seren ist deshalb verständlich, da ja die Serumkolloide schon physiologischerweise mengenmäßigen Schwankungen und Änderungen ihres Verhältnisses zueinander unterworfen sind.

Durch eine nach der Enteiweißung vorgenommene Farbstoffmessung werden keineswegs wesentlich bessere Ergebnisse erzielt (Abb. 7). Mit der Enteiweißung des Serums tritt ein neuer bedeutender Fehler auf. So konnte je nach dem verwendeten Enteiweißungsmittel eine größere oder kleinere Differenz der Extinktionswerte nachgewiesen werden, wenn man Serumlösungen gegeneinander photometrierte, denen vor und nach der Enteiweißung eine bestimmte, gleich große Menge Pr. S. zugesetzt worden war. Bei Verwendung einer 10%igen Trichloressigsäurelösung wurde ein Fehlbetrag von $E = 0{,}035$, der Natriumwolframatlösung von $E = 0{,}520$ und der verdünnten Salzsäure von $E = 0{,}359$ verursacht, wenn eine Menge

von 20 γ Pr. S. in 5 ccm Lösung mit dem Filter S 50 bei einer Schichtdicke von 5 cm gemessen wurde (4, 5). Diese Fehler waren nach der Enteiweißung verschiedener Seren mit den angeführten Fällungsmitteln durchaus nicht gleich groß. Nach der Enteiweißung war eine gewisse Menge des Pr. S. verschwunden. Ließ man Pr. S.-haltiges Plasma gerinnen, so trat auch hier eine sichtbare Rotfärbung des Gerinnsels infolge einer Pr. S.-Adsorption an das ausgefallene Fibrin ein. Der Farbstoff saß am Eiweiß so fest, daß er durch Auswaschen von ihm nicht abgelöst werden konnte.

Es wäre eine dankenswerte Aufgabe, quantitativ festzustellen, in welchem Maße einzelne Eiweiße (Organ-, Muskel-, Nerveneiweiß usw.) unter den verschiedensten Bedingungen das Pr. S. an sich reißen.

Ob die im Tierversuch durch Pr. S.-Präparate hervorgerufene kumulative Vergiftung, die bei Überdosierung bemerkten zentralen Erregungserscheinungen, die durch Prontosil rubrum beim Menschen manchmal aufgetretenen Parästhesien und die bei lange fortgesetzter unkontrollierter Einnahme von Pront. rubrum mitgeteilten Anämien mit ähnlichen Adsorptionserscheinungen, wie für das Pr. S. nachgewiesen, im Zusammenhange stehen und welche Bedeutung dieser Erscheinung für den Wirkungsmechanismus der Pr.-Körper und für die gesamte Chemotherapie zukommt, muß späteren Untersuchungen überlassen bleiben. Man darf mit einer gewissen Berechtigung annehmen, daß die Pr.-Mittel ihre günstigste therapeutische Wirkung in den Organen entwickeln werden, wo besonders große Mengen dieser Stoffe haften bleiben. Vielleicht ist die übereinstimmend beobachtete gute Pr. rubrum-Wirkung beim Erysipel gerade auf die bekannte Speicherung dieses basischen Azofarbstoffs in der sich gelblich verfärbenden Haut zurückzuführen, freilich nicht in dem Sinne, daß die Kokken abgetötet würden, denn bekanntlich (6) entfalten die Prontosilpräparate in vitro gegenüber Kokken keine oder so gut wie keine Wirkung. Deshalb wird dem Organismus für die Wirkungsweise des Pr. eine ganz besondere Rolle zugeschrieben. Ob die Mithilfe des Organismus nun unbedingt notwendig ist, soll hier unentschieden bleiben. Darüber können nur weitere chemotherapeutische Versuche Aufklärung bringen. Folgender Gedankengang aber bietet eine einleuchtende Erklärung für die nur im Makroorganismus festgestellte Pr.-Wirkung:

Es ist nicht ausgeschlossen, daß die für das Pr. nachgewiesene Adsorption an die Eiweißstrukturen und Serumkolloide in ähnlicher Weise auch für eine Anlagerung des Pr. S. und der übrigen Prontosilpräparate an die Bakterientoxine (Abb. 8, *A*) zutrifft. So könnte Pr. mit den Toxinen (*B*) oder dem Organeiweiß (*C*) oder mit beiden gleichzeitig eine Bindung eingehen, nicht nach Art einer echten Neutralisation, sondern einer ganz lockeren Anlagerung im Sinne einer Adsorption und dadurch die Haftfähigkeit der Kokkentoxine, die in ihren Einzelheiten noch nicht vollkommen aufgeklärt ist, aufheben bzw. ihr Festhaften an den Organzellen verhindern. Dies würde die Verhütung der schädigenden Toxinwirkung in

den Organen und die Verhinderung einer Vorbereitung des Gewebes für die Kokkenansiedlung bedeuten. Wäre nun die adsorptive Kraft der Organeiweiße gegenüber Pr. größer als die Haftfähigkeit der Toxine, so könnte das Pr. sogar nach Ausbruch der Infektion die Toxine aus ihren Haftstellen verdrängen und durch Lösung der Giftbindung weiteren Giftschäden ent-

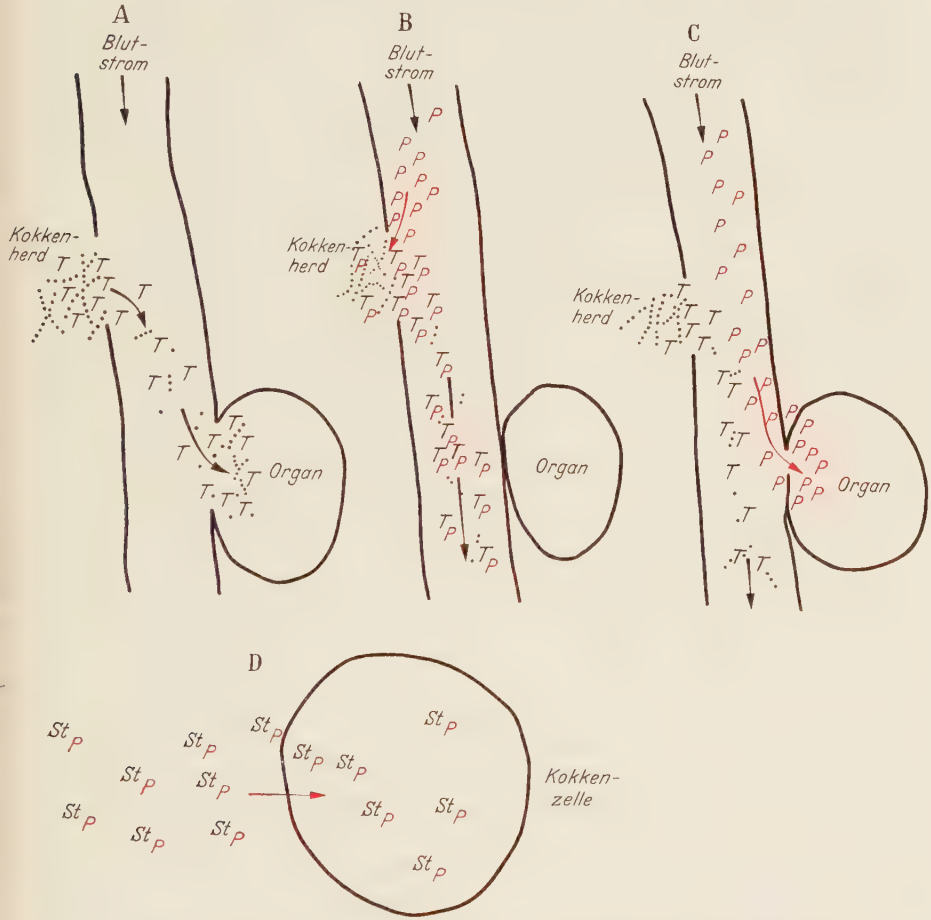


Abb. 8. Schematische Darstellung der Prontosilwirkung. T: Toxine, P: Prontosil, St: Für den Kokkenleib notwendige Stoffwechselkörper, die der Wirtsorganismus liefert.

gegenwirken, so daß für die Kokken keine Möglichkeit zur Niederlassung im Gewebe mehr besteht. Der Beweis für einen solchen Konkurrenzantagonismus, wenn man diesen Ausdruck hier benutzen darf, würde unabsehbare Ausblicke eröffnen, zumal mit chemisch wohl charakterisierten Mitteln die Möglichkeit geboten wäre, in die Struktur und Bindung der Toxine neues Licht zu bringen. Die Adsorption des Pr. an die Serumkolloide könnte

ferner sein Eindringen in den Bakterienleib dadurch ermöglichen, daß die Kolloide als Pr.-Vehikel dienen und das Pr. beim Stoffwechselaustausch in das Bakterieninnere einschleppen (Abb. 8, *D*).

Die Adsorption eines chemischen Mittels an Bakterientoxine, an Serumkolloide und an das Organeiweiß, die dadurch bedingte Entgiftung bzw. Beseitigung der Bindungsfähigkeit der Toxine und der Transport des an die Kolloide adsorbierten Pr. in die Bakterienzellen würde manches bisher Unerklärliche verständlich machen, z. B. die nur im Makroorganismus festgestellte Pr.-Wirkung, den im Tierversuch beobachteten prophylaktisch günstigen Einfluß (7), die guten Erfolge bei der Erysipelbehandlung, die für die Streptokokken spezifische Wirkung der Prontosilpräparate, die Verhinderung der Keimansiedlung in den Geweben, das Ausbleiben von Nekrosen und entzündlichen Infiltraten und die Unterstützung der natürlichen Abwehrkräfte des Organismus. Um einen sicheren Erfolg mit Pr. zu erzielen, müßte deshalb ein Pr.-Spiegel im Blute von ganz bestimmter Höhe aufrechterhalten werden, damit das Organeiweiß ausreichend mit Pr. besetzt oder die Bakteriengifte genügend beladen werden, um so ihren Angriff auf das Körpergewebe zu vereiteln. Nimmt man an, daß nur an bestimmte Kolloide, nämlich an für den Stoffwechsel der Bakterien notwendige Körper adsorbierte Präparate in die Kokken einwandern können und sie außerdem eine spezifische Wirkung auf die Kokkentoxine ausüben, so wäre zur Aufklärung der Wirkungsweise der Prontosilkörper und bei der Suche nach weiteren Chemotherapeutica gegen bakterielle Infektionen besonders das Verhalten der chemischen Mittel gegen die Bakteriengifte und der Transport der chemischen Mittel in die Bakterienzellen ins Auge zu fassen und entsprechende Versuchsbedingungen zu wählen.

Das unregelmäßige Verhalten der typischen Farbkurven und die sehr voneinander unterschiedlichen Extinktionswerte Pr. S.-haltigen Serums unterbanden eine einwandfreie Messung seines Farbstoffgehalts. Wollte man die durch die Serumkolloide, die Enteiweißung oder Gerinnung hervorgerufenen Fehler vermeiden, dann schien eine Isolierung des Farbstoffs unerläßlich, wie denn überhaupt die exakte Messung vieler in einer physiologischen Flüssigkeit befindlichen Farbstoffe aus den obenerwähnten Gründen nur dann durchgeführt werden kann, wenn sie quantitativ von den störenden Begleitsubstanzen abgetrennt worden sind.

Die quantitative Isolierung der kleinen hier in Frage kommenden Pr. S.-Mengen erschien zunächst ziemlich schwierig. Lösungsversuche einer bei 110° konstant getrockneten Pr. S.-Substanz, die durch Verdunsten der käuflichen Lösung im evakuierten Exsikkator gewonnen worden war, ergaben völlige Unlöslichkeit des Pr. S. in absolutem Alkohol, Aceton, Amylalkohol, Chloroform, Benzol, Petroläther und Toluol. Nach Ansäuern einer wässerigen Pr. S.-Lösung mit verdünnter Salzsäure ging der Farbstoff beim Schütteln mit Amylalkohol nicht vollständig in diesen über, der sich hellrot färbte und beim Schütteln mit verdünnter Natronlauge den ge-

samten Farbstoff wieder in die wässerige Schicht abgab. Die Gewinnung des Pr. S. aus dem Serum etwa durch Extraktion war also nicht durchführbar, zumal das beim Schütteln von Pr. S.-Serum mit Amylalkohol ausgefällte Eiweiß sehr große Mengen Farbstoff adsorbierte. Die Fällung des Pr. S. in wässeriger Lösung mit Schwermetallsalzen wie Kupfer-, Zink-, Nickelsulfat und Quecksilberchlorid war ebenfalls unmöglich. Die mit salzsaurem β-Naphthylamin entstehende Fällung war schon in wässeriger Pr. S.-Lösung nicht quantitativ, viel weniger in einer physiologischen Flüssigkeit wie Serum.

Dagegen konnte die Abtrennung des Pr. S. aus dem Plasma und wenn möglich auch aus dem Vollblut unter Vermeidung der Gerinnung und Umgehung der durch Fällungsmittel erzielten Enteiweißung vielleicht durch Adsorptionsmittel erreicht werden, die in ihrer Bindungskraft gegenüber in Lösung befindlichen Stoffen erstaunlich feine Unterschiede aufweisen. Besonders das 1906 von Tswett eingeführte Verfahren der chromatographischen Adsorptionsanalyse versprach für die hier zu lösende Aufgabe Aussicht auf Erfolg. Diese Arbeitsweise ermöglicht die Isolierung und Einengung kleinster Farbstoffmengen bis zu einer für ihre Messung notwendigen Konzentration. Die chromatographische Adsorptionsmethode (8) wird in der Chemie zur Trennung und Darstellung natürlicher und künstlicher Farbstoffe, zur Isolierung von pflanzlichen und tierischen Giften, Alkaloiden, Enzymen, Vitaminen und Hormonen, zur Einengung und Prüfung gewisser Substanzen auf ihre Reinheit usw. in der jüngsten Zeit in immer ausgedehnterem Maße angewandt. In die klinischen Laboratorien hat sie jedoch bisher so gut wie keinen Eingang gefunden, weshalb hier an einem praktischen Beispiel gezeigt werden soll, was diese Arbeitsweise für klinisch-chemische Untersuchungen zu leisten vermag.

Langwierige, vergleichende chromatographische Studien zwischen wässerig neutralen, sauren, alkalischen Pr. S.-Lösungen und Pr. S.-haltigem Plasma und Vollblut wurden mit Aluminiumoxyd, Floridin XXF, Floridin XS, Talkum, Magnesiumoxyd, Kieselgur, Frankonit KL, Calciumsulfat, Kaolin, reiner Kieselsäure, Natriumcarbonat und gewöhnlicher Bleicherde durchgeführt.

Bei den Vorversuchen wurden nebenbei bemerkenswerte Eigenschaften des Bilirubins (Roche) und Indigokarmins (Bayer) in ihrem Verhalten gegen gewisse Adsorptionsmittel beobachtet, die eine Möglichkeit zu ihrer Bestimmung bieten. Diese Untersuchungen werden weitergeführt. Hier möchte ich die Ergebnisse der Adsorptionsversuche nur insoweit berichten, als sie unmittelbar für die vorliegende Arbeit von Wichtigkeit sind.

Zur Trennung des Pr. S. vom Plasma und Vollblut erwiesen sich die Adsorptionsmittel Talkum* und Frankonit** als am besten geeignet. Filtriert man nämlich an der Wasserstrahlpumpe mit Liquoid (Roche)

* D. A. B. 6, extraweiß. — ** Dr. Fraenkel u. Dr. Landau.

ungerinnbar gemachtes, mit n/10 HCl hämolysiertes, Pr. S.-haltiges Blut durch eine Talkumsäule (Abb. 9, *a*), dann wird das Pr. S. und ein Teil des Blut- und Plasmafarbstoffs und des Gallenfarbstoffs in der obersten Säulenschicht festgehalten. Der größte Teil des Blut- und Plasmafarbstoffs aber und die Serumkolloide nebst den Salzen gehen in das zu verwerfende Filtrat. Durch Nachwaschen mit n/10 NaOH vermag man das Pr. S. und eine gewisse Menge der am Talk haftenden Farbstoffe des Blutes abzulösen. Dabei geht Pr. S. schnell, Bilirubin unter teilweiser Oxydation langsam durch die Säule (*b*). Der am Talk haftenbleibende Blutfarbstoff ist als vorwiegend graue Zone im obersten Bereiche der Talksäure sichtbar. Das Filtrat, in dem sich jetzt Pr. S. und etwas Blut- und Plasmafarbstoff, manchmal auch kleine Mengen Bilirubin und Biliverdin befinden, nimmt eine hellbraune, leicht grünliche Färbung an. Von dem in der Lösung noch vorhandenen Farbstoff des Blutes gelingt die Abtrennung des Pr. S. dadurch, daß man das mit verdünnter HCl bis zu einer Säurekonzentration von ungefähr $^1/_{30}$ bis $^1/_{50}$ Normalität angesäuerte nun hellbraun, etwas orange gefärbte Filtrat durch eine Frankonitsäule saugt (*c*). Dadurch bleibt praktisch der gesamte restliche noch aus dem Blute stammende Farbstoff in der obersten Schicht der Frankonitsäule hängen, und das Pr. S. geht allein in die Vorlage über.

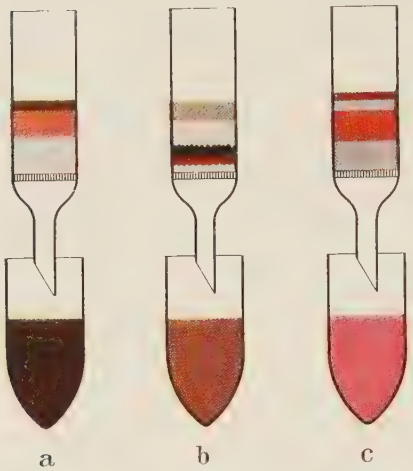


Abb. 9. Chromatographie Prontosil sol.-haltigen Blutes.

Abb. 10. Chromatographie Prontosil sol.-haltigen Plasmas.

So behandeltes Plasma von Kranken mit Ikterus gibt kleine Mengen Bilirubins und einen geringen Teil der Plasmafarbe an den Talk ab (Abb. 10, *a*), der sich dabei blaßgelb verfärbt. Ein erheblicher Teil der Plasmafarbe und des Bilirubins, wenn große Mengen von ihm vorhanden sind, gelangt in das zu verwerfende Filtrat. Durch Nachwaschen mit

n/10 NaOH wird das sich dunkelgelb färbende Bilirubin unvollständig abgelöst, wandert im Talk langsam und wird teilweise zu Biliverdin oxydiert (*b*). Beim Ablösen des rasch durch die Säule gehenden Pr. S. mit Lauge etwa in das 2. Filtrat übergehendes Bilirubin und Biliverdin und geringe Mengen des sauer vom Talk festgehaltenen, mit der Lauge von ihm abgelösten Plasmafarbstoffs werden sauer vom Frankonit (*c*) völlig zurückgehalten. Das im letzten sauren, rosagefärbten Filtrat befindliche Pr. S. läßt sich dann leicht an eine frische Talksäule adsorbieren und seine Ablösung mit kleinsten Mengen Lauge erzwingen, sofern man nur den Durchmesser dieser

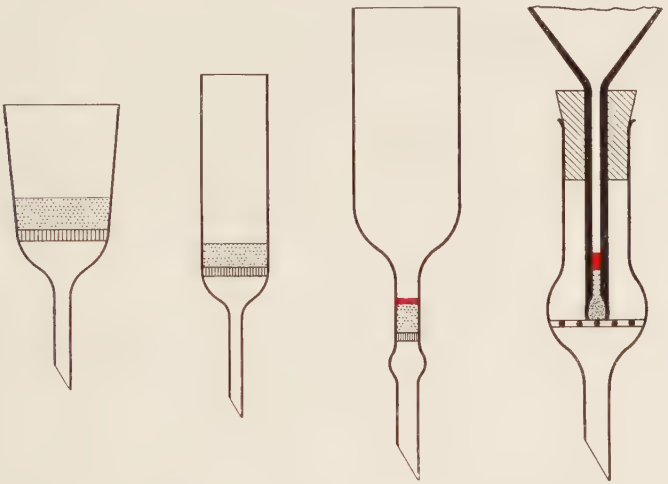


Abb. 11. Kleinste Mengen Prontosil sol. in großen Flüssigkeitsmengen werden zur Abkürzung der Filtrationsdauer an verschiedene, immer kleinere Talkschichten adsorbiert und von ihnen abgelöst. An der sehr kleinen Oberfläche einer Mikrosäule wird dann der auf engstem Raum konzentrierte Farbstoff sichtbar.

Talksäule klein genug wählt. Auf diese Weise sind in $^1/_2$ ccm Vollblut oder 1—2 ccm Plasma mit einiger Übung im Modellversuch Pr. S.-Mengen bis zu 0,04 γ (Lupe) nachweisbar. Dabei verfährt man wie oben angegeben, benutzt aber nicht eine hohe Säule, sondern nur eine dünne Schicht der Adsorptionsmittel. Durch planmäßiges Leiten der Adsorption des Pr. S. Farbstoffs aus dem ungefähr n/10 HCl-sauren Frankonitfiltrat an den Talk einer zunächst ziemlich ausgebreiteten und dann im Umfange immer kleiner werdenden Schicht, um die Filtrationsdauer zu verkürzen, und der Elution des vom Talk gebundenen Pr. S. mittels n/10 Lauge konzentriert man die Pr. S.-haltigen Filtrate bis auf 1 oder 2 ccm Lösung. Diese kleine Filtratmenge wird zuletzt durch eine Mikrosäule in einem Spezialfilterröhrchen von 1 mm Durchmesser abgesaugt (Abb. 11). Bei Anwesenheit kleinster Pr. S.-Mengen wird dann im obersten, manchmal im unteren Teile der ungefähr 5 mm hohen Mikrosäule, bei größeren Pr. S.-Mengen schon auf einer

Säule mit größerem Durchmesser, eine mehr oder weniger deutliche blaßrote Zone sichtbar. Die Oberfläche der Mikrosäule ist schwach hellbraun verfärbt. Diese Farbe rührt wohl aus dem Frankonit KL her.

Um ein lästiges Schäumen, das bei der ersten Filtration des hämolysierten Blutes auftritt, zu vermeiden, gibt man in die erste Vorlage einen Tropfen Oktylalkohol. Eine eingehende Analyse der in den einzelnen Fraktionen vorhandenen farbigen und farblosen Bestandteile wurde nicht durchgeführt, könnte aber in mancher Hinsicht für andere Arbeiten wertvoll sein.

Da es gelang, das Pr. S. von den Serumkolloiden auf physikalisch-chemischem Wege abzutrennen, weil offenbar die adsorptive Kraft des Talks gegenüber dem Farbstoff größer ist als diejenige der Kolloide, dürfte die Behauptung, es handelt sich bei der Pr. S.-Bindung an die Kolloide um einen physikalisch-chemischen Vorgang, berechtigt sein. Jedenfalls kann nur eine sehr lockere Bindung des sauren Azofarbstoffs an die Kolloide vorliegen, während er an den Strukturen des Eiweißes wesentlich fester haftet.

Damit war das Problem der quantitativen Pr. S.-Isolierung aus Vollblut und Plasma gelöst und eine ziemlich genaue Bestimmung dieses Farbstoffs möglich, da durch den Arbeitsgang die Analyse kaum beeinträchtigende Substanzverluste an Pr. S. entstehen.

Die Vorversuche sprechen dafür, daß sich mit grundsätzlich derselben Arbeitsweise auch andere körpereigene und körperfremde Farbstoffe und farblose Körper aus Blut und Plasma unter Umgehung einer Enteiweißung durch Ausfällung, unter Vermeidung der Gerinnung und ohne Behandlung des Blutes oder Plasmas mit organischen Extraktionsmitteln allein in wässerigem Milieu zum Zwecke ihrer Bestimmung isolieren lassen, und zwar nicht nur dann, wenn sie wie das Indigokarmin gegenüber den hier benutzten Adsorptionsmitteln fast die gleichen Eigenschaften wie das Pr. S. zeigen. Die Abtrennung von Farbstoffen mit einem anderen Verhalten zwingt man dann durch sinngemäße Abwandlung des Arbeitsganges und durch Heranziehung und entsprechende Kombination anderer Adsorptionsmittel. So wird sich in Zukunft die Adsorptionsmethode auch im klinischen Laboratorium für Untersuchungen über das Verhalten körperfremder Farbstoffe im Organismus, für Funktionsprüfungen, zur Bestimmung der kreisenden Blutmenge usw. als nützlich erweisen und zur Lösung verschiedener damit im Zusammenhange stehender Fragen beitragen. Ferner dürfte die Kenntnis von den Eigenschaften des Pr. S. gegenüber den Adsorptionsmitteln für präparative Arbeiten mit diesem Farbstoff nicht unwichtig sein.

Als Filtergeräte wurden Jenaer Glasfilter verwendet, die mit einer Aufschwemmung des Adsorptionsmittels in verdünnter Salzsäure von der notwendigen Säurekonzentration beschickt wurden. Dann wurde das Adsorptionsmittel an der Wasserstrahlpumpe auf die Filterplatte festgesaugt, so daß sich eine gleichmäßig hohe Schicht bildete.

Bei den quantitativen Arbeiten machte sich der Carbonatgehalt des Talks, eines wasserhaltigen Magnesiumsilikates, dadurch störend bemerkbar, daß sich durch das Ansäuern mit Salzsäure Kohlensäuregasblasen entwickelten, welche die Schicht des Adsorptionsmittels auflockerten und zerrissen und so eine gleichmäßige Adsorption und Elution des Pr. S. ungünstig beeinflußten. Außerdem ging bei der Ablösung des Pr. S. mit verdünnter Lauge eine geringe Menge der im Talk vorhandenen Kieselsäure in Lösung, die später beim Ansäuern der zu messenden Endlösung ausfiel und durch Trübung der Flüssigkeit die Meßergebnisse fälschte. Deshalb mußte der käufliche Talc. ven. albiss. pulv. subt. D. A. B. 6 in folgender Weise vorbehandelt werden:

100 g Talk wurden in 300 ccm verdünnter Salpetersäure unter Umschütteln 2—3 Tage lang stehengelassen, bis keine Gasblasen mehr aufstiegen. Danach saugte man den Talk auf einem Glasfilter ab und wusch mit destilliertem Wasser so lange nach, bis die Waschflüssigkeit neutral reagierte. Nun wurde der Talk in 300 ccm verdünnter Natronlauge eingetragen und wiederum unter mehrmaligem Umschütteln stehengelassen. Die sich gelblich verfärbende Natronlauge erneuerte man täglich, bis sie farblos blieb, saugte den so behandelten Talk wieder ab und wusch die Lauge mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion aus. Durch diese Behandlung wurden aus dem Talk durchschnittlich 2% Carbonate und Spuren Kieselsäure entfernt.

Bedeutungsvoll für die weiteren Untersuchungen war das Verhalten der Lichtabsorption des Pr. S. nach dem Durchgang durch die für die Analyse gewählten Adsorptionsmittel Talk und Frankonit KL.

Adsorbierte man genau 20 γ Pr. S. in n/10 HCl-saurer Lösung an den präparierten Talk auf einem Glasfilter von 1 cm Durchmesser und wusch den Farbstoff mit 2,5 ccm n/10 NaOH wieder ab, so fand man nach Ansäuern mit 0,5 n HCl bis auf ein Volumen von 5 ccm mit dem Spektralfilter S 50 bei einer Schichtdicke von 5 ccm alles Pr. S. wieder. Die typische Farbkurve besaß dieselbe charakteristische Gestalt wie die der alkalischen und mit 0,5 n HCl sauer gemachten Pr. S.-Lösung (Abb. 3). Daraus folgt, daß der Talk die Lichtabsorption des Pr. S. nicht beeinträchtigt.

Zur Bestimmung der adsorbierenden Kraft des Talks gegenüber dem Pr. S. wurden 250 mg Talk bei 110° konstant getrocknet, auf einem Filter von 1 cm Durchmesser angesaugt und mit einer n/10 HCl sauren Pr. S.-Lösung gesättigt, dann nach sorgfältigem Nachwaschen mit n/10 HCl mittels 10,0 ccm n/10 NaOH vom Talk abgelöst und das Filtrat mit 0,5 n HCl auf 20 ccm aufgefüllt. Bei einer Schichtdicke von 5 cm mit dem Filter S 50 wurde eine Extinktion von 0,573 als Mittelwert von 5 Versuchen gefunden. Dieser Wert entspricht 11,78 γ Pr. S. Unter Berücksichtigung der 4fachen Verdünnung der Endlösung wurden also von 250 mg Talk 47,12 γ Pr. S. adsorbiert, was einem Adsorptionsverhältnis von 5000 : 1 nahekommt.

Nach dem Durchgang des Pr. S. durch die mit Salzsäure aktivierte Bleicherde Frankonit KL, ein Aluminiumhydrosilikat von tonähnlichem Charakter, in dem spektroskopisch die Elemente Silicium, Eisen, Aluminium, Magnesium, Calcium und Spuren Natrium nachgewiesen werden konnten, war das Pr. S. jedoch irgendwie verändert. Genau 20 γ Pr. S. in n/50 HCl-saurer Lösung wurden durch 0,4, 0,8 und 1,2 g Frankonit KL filtriert und das Adsorptionsmittel mit ungefähr 200 ccm n/50 HCl ausgewaschen. Das mit verdünnter HCl auf eine Säurekonzentration von ungefähr n/10 Normalität gebrachte rosa Filtrat wurde an 1 g Talk auf einem Glasfilter 3 G 3 adsorbiert und eingeengt, von letzterem mit zweimal 2 ccm n/10 NaOH abgelöst und nach Ansäuerung wieder an einer 250 mg schweren Talksäule auf einem Glasfilter von ungefähr 1 cm Durchmesser festgehalten. Dieses Adsorbat löste man mit 2,5 ccm n/10 NaOH ab und füllte das Filtrat einmal mit 0,5 n HCl, ein andermal mit n/10 NaOH auf 5 ccm auf. Die Messung dieser Endlösung wurde gegen eine entsprechende Kompensationslösung eines Leerversuchs bei einer Schichtdicke von 5 cm mit allen Spektralfiltern vorgenommen. So wurden die in Abb. 12 niedergelegten typischen Farbkurven aufgestellt. Die Kurven der durch den Frankonit KL filtrierten, sauer und alkalisch gemessenen Pr. S.-Lösung (Kurve 4 bzw. 2) fallen durch eine Parallelverschiebung gegenüber der typischen Farbkurve von Lösungen auf, die den Frankonit KL nicht passiert haben (Kurve 3 bzw. 1). Das Kurvenbild der sauren und alkalischen Farbstofflösungen ist vor und nach dem Durchgang des Pr. S. durch den Frankonit KL völlig gleich. Durch dieses Adsorptionsmittel wurde der Charakter der von den sauren und alkalischen Lösungen stammenden Kurven nicht verändert. Lediglich die Lichtabsorptionswerte der durch den Frankonit KL gesaugten Lösungen liegen etwas tiefer als diejenigen der Lösungen, die ohne Filtration gemessen wurden, und zwar für die saure Lösung im Bereich des Filters S 50 um 7,5 %, im Gebiet des Filters S 53 um 9,5 %, für die alkalische um 3 bzw. um 8,5 %. Die typische Farbkurve der durch den Frankonit KL filtrierten sauren Lösung deckt sich trotz der starken Ansäuerung der Endlösung mit 0,5 n HCl merkwürdigerweise mit derjenigen einer wässerigen oder nur mit n/10 HCl angesäuerten Pr. S.-Lösung gleichgroßen Farbstoffgehaltes (siehe

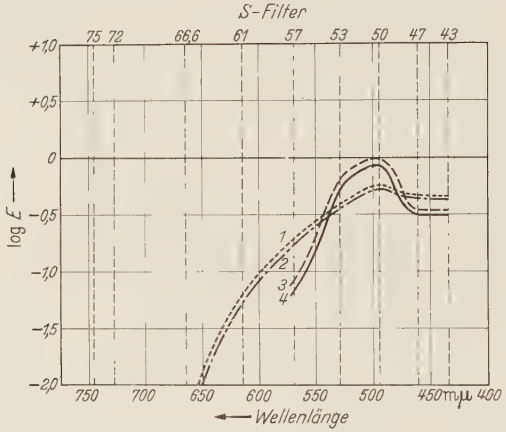


Abb. 12. Typische Farbkurven von Prontosil sol.-Lösungen vor und nach dem Durchgang durch Frankonit KL.

Abb. 3!). Stellte man nun die Extinktion einiger Farbstofflösungen mit verschiedenem Pr. S.-Gehalt vor und nach der Filtration durch eine Frankonit KL-Schicht fest, dann beobachtete man immer dieselbe prozentuale Differenz, ganz gleich, ob man die Farblösungen durch 0,4, 0,8 und 1,2 g Frankonit KL fließen ließ. Die letztere Tatsache und die Möglichkeit, daß man 0,04 γ Pr. S. aus Vollblut oder Plasma mit dem Arbeitsgang isolieren und sichtbar machen konnte, sprechen nicht dafür, daß es sich bei der festgestellten Differenz um einen Verlust an Farbstoff etwa durch Verschwinden des Pr. S. infolge seiner Zerstörung durch den Frankonit KL oder einer nur teilweisen Elution des Pr. S. aus ihm handelte. Vielleicht bewirkt der Frankonit KL eine Änderung im Pr. S.-Molekül, die den Farbstoffcharakter nicht beeinflußt, aber die Lichtabsorption des Pr. S. in einem gleichmäßigen Sinne um einen bestimmten prozentualen Betrag verringert. Diese Erscheinung ist beim Gebrauch eines aktivierten Adsorptionsmittels durchaus möglich. Nur muß man an ein solches Verhalten aktivierter Adsorbentien denken, weil sonst ihre Benutzung zu quantitativen Arbeiten beinahe unüberwindliche Schwierigkeiten bereiten kann.

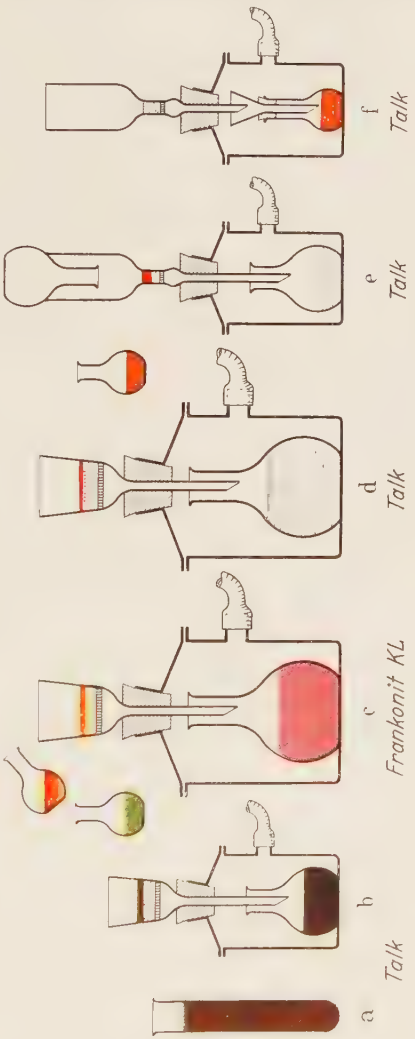


Abb. 13. Schematische Darstellung des Analysenganges.

Die Menge der zum Auswaschen der Frankonit KL-Schicht benutzten Waschflüssigkeit hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die Pr. S.-Bestimmung. Leerversuche mit 200, 400, 800 ccm n/50 HCl und mit 200, 400, 800 ccm n/10 HCl führten zu einer praktisch farblosen Endlösung, die in den Gebieten der Spektralfilter S 50 und S 53 nie eine größere Extinktion als E 0,003 aufwies. Dieser Fehler wurde dadurch vollständig ausgeschaltet, daß man die Messung der Pr. S.-haltigen

Endlösung gegen die Endflüssigkeit einer Blindanalyse als Kompensation vornahm.

Die Erkennung und Untersuchung der Fehlerquellen der Pr. S.-Messung und die Ergebnisse der Adsorptionsversuche führten zwangsläufig zu folgender Bestimmungsmethode des Pr. S. im Vollblut und Plasma (Abb. 13):

Von ungefähr 1,5 ccm Blut, das mit einer Spritze aus der Armvene entnommen und in ein trockenes, mit einer Spur Liquoid in Substanz beschicktes Gläschen entleert und mit einem Glasstäbchen gut durchgerührt worden ist, wird genau $^1/_2$ ccm in ein Reagensglas abgemessen und mit 20 ccm n/10 Salzsäure versetzt, damit die Flüssigkeit lackmussauer wird. Wenn vollständige Hämolyse, Braunfärbung und Durchsichtigkeit der Blutlösung eingetreten ist (*a*), wird sie über 1,5 g vorbehandeltem Talk, der nach Aufschwemmung in n/10 HCl auf einem Glasfilter 3 G 3 mit der Wasserstrahlpumpe festgesaugt worden ist, in ein 1—2 Tropfen Oktylalkohol enthaltendes Kölbchen filtriert (*b*). Das Reagensglas wird mit n/10 Salzsäure ausgespült und die Flüssigkeit zur Nachspülung der Talkschicht benutzt. Es wird so lange nachgewaschen, bis sich unter der Glasfilterplatte keine Schaumblasen mehr zeigen. Dazu benötigt man in der Regel 50—70 ccm n/10 Salzsäure. Zuletzt spritzt man bei mit n/10 HCl gerade eben noch bedeckter Talkschicht die Filterwand ab und saugt alle Flüssigkeit durch. Jetzt wird die Vorlage schnell gewechselt und der Talk mit zweimal 5 ccm n/10 Natronlauge langsam ausgewaschen, so daß die in die Vorlage tropfende Flüssigkeit völlig farblos wird. Hierauf spült man mit zweimal 5 ccm n/10 HCl den noch in der Glasfilterplatte hängenden Farbstoff vollends durch. Das leicht olivgrün aussehende Filtrat wird nun mit $^1/_4$ ccm HCl von der Dichte 1,040 versetzt, um seine Säurekonzentration ungefähr auf $^1/_{50}$ Normalität zu bringen. Dabei färbt sich die Flüssigkeit hellbraun und mehr oder weniger orange, je nach der Menge des in der Flüssigkeit befindlichen Pr. S. Diese saure Lösung filtriert man jetzt durch 0,4 g Frankonit KL (*c*), der nach Aufschwemmung in n/50 Salzsäure ebenfalls an die Filterplatte eines Glasfilters 3 G 3 angesaugt worden ist, in eine mit 10 ccm Salzsäure von der Dichte 1,040 beschickte Vorlage und wäscht mit rund 200 ccm n/50 HCl nach. Das saure rosa Filtrat wird nun über 1 g Talk (*d*), der sich wiederum in einem Glasfilter 3 G 3 befindet, eingeengt, von ihm mit zweimal 2 ccm n/10 Natronlauge in ein kleines Kölbchen abgelöst und mit zweimal 2 ccm n/10 Salzsäure nachgespült. Nach Ansäuerung dieses Filtrates mit 0,4—0,5 ccm Salzsäure von der Dichte 1,040 saugt man die Flüssigkeit durch eine 250 mg schwere Talksäule (*e*), die nach Aufschwemmung in wenig n/10 Salzsäure in einem Spezialfilterrohr mit einer Glasfilterplatte von 1 cm Durchmesser hergestellt worden ist. Auf dieser Säule sind noch 0,2 γ Pr. S. erkennbar. Von dieser Talksäule wird das Pr. S., nachdem man mit zweimal 5 ccm n/10 HCl unter gleichzeitigem Ausspülen der letzten Vorlage die mit dem Pr. S.-Farbstoff behaftete Talk-

säule nachgewaschen hat, mit genau 2,5 ccm n/10 Natronlauge unmittelbar in ein mit einem kleinen Trichter versehenes Meßkölbchen von 5 ccm Inhalt filtriert (*f*) und das alkalische dunkelrote Filtrat mit 0,5 n HCl aufgefüllt. Nach gutem Durchschütteln wird diese saure Endlösung bei einer Schichtdicke von 5 cm unter Benutzung einer Mikroküvette mit dem Spektralfilter S 50 und zur Kontrolle mit S 53 gegen die Kompensationslösung eines Leerversuchs photometriert. Sind die Pr. S.-Mengen recht klein, die man nach der Breite der roten Zone auf der letzten Säule ganz gut schätzen kann, dann löst man den Farbstoff nur mit genau 1,5 ccm n/10 Natronlauge in ein 3 ccm-Meßkölbchen ab und füllt mit 0,5 n HCl bis zur Marke auf.

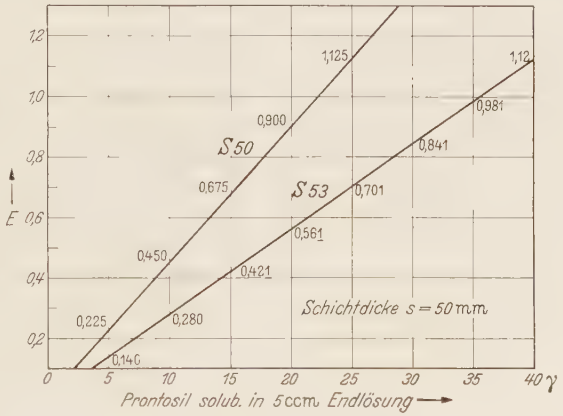


Abb. 14. Eichkurve.

Für die Bestimmung des Pr. S. im Plasma wird letzteres durch Abschleudern des mit Liquoid ungerinnbar gemachten Blutes gewonnen, dann 1 oder 2 ccm Plasma mit ungefähr 20 ccm n/10 Salzsäure angesäuert und im übrigen genau so verfahren wie für die Pr. S.-Bestimmung im Vollblut beschrieben.

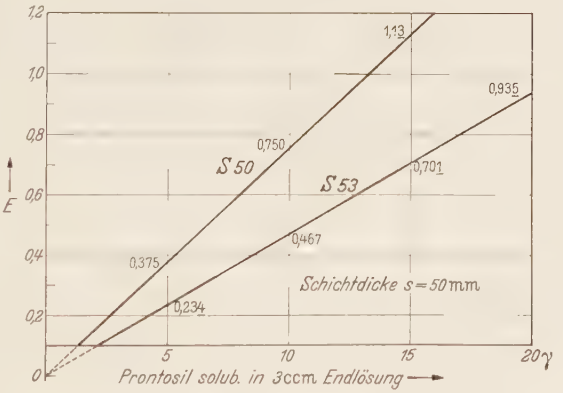


Abb. 15. Eichkurve.

Eine Analyse mit Blut oder Plasma ohne Pr. S. zur Gewinnung einer Kompensationslösung ist nicht notwendig, da die Extinktion zahlreicher Blut- und Plasmaanalysen nie mehr als $E = 0{,}003$, also auch nicht mehr als die Extinktion der wässerigen Blindanalyse betrug. Voraussetzung dabei ist, daß mit peinlich sauberen Glasfiltern gearbeitet wird, die man am besten nach jedem Gebrauch mit einigen ccm heißen Ammoniaks und danach verdünnter Salzsäure durchspült, damit eine etwa in der Filterplatte vorhandene gelbliche Farbe völlig verschwindet. Über Nacht legt man die Filter zweckmäßig in ein Salpetersäure-Schwefelsäuregemisch und spült

sie vor Gebrauch sorgfältigst mit destilliertem Wasser aus. Graue Gummistopfen benutzen.

In den Endlösungen, die mit Vollblut oder Plasma ohne Pr. S. erhalten wurden, konnten kein fällbares Eiweiß und keine N-haltigen Substanzen nachgewiesen werden. Asche wurde nicht mehr gefunden als durch die Verwendung von Lauge und Säure bei der letzten Elution in die Endlösung gelangt war. Die Berliner Blau-Reaktion auf vielleicht aus dem Frankonit KL stammendes Eisen fiel in der Endlösung negativ aus.

Die Auswertung der Messungen geschieht mit Hilfe von Eichkurven, wie sie in der Abb. 14 für 5 ccm Endlösung, in der Abb. 15 für 3 ccm Endlösung abgebildet sind, indem man aus ihnen die zu dem mit den Spektralfiltern S 50 oder S 53 gefundenen Mittelwert gehörige Pr. S.-Menge in γ abliest, oder durch Berechnung. Für die Kurven in Abb. 14 und 15 wurden Pr. S.-Lösungen mit einem Gehalt von 20 γ nach Durchlauf des Analysenganges in 5 ccm bzw. 3 ccm Endlösung bei einer Schichtdicke von 5 cm mit den Filtern S 50 und S 53 gemessen. Aus dem durch je 10 Ablesungen unter Vertauschung der Küvetten gewonnenen Mittelwert für 20 γ wurden die übrigen Kurvenpunkte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet. für das folgende Beziehung gilt:

$$I = I_0 \cdot 10^{-K \cdot c \cdot s}, \tag{1}$$

wobei I_0 die Intensität des eingestrahlten Lichtes, I die Intensität des durchgelassenen Lichtes, s die Schichtdicke in cm, c die Farbstoffkonzentration der Lösung und K die Extinktionskonstante der Farblösung bedeuten. Durch Logarithmieren der Gleichung bekommt man

$$K \cdot c \cdot s = \left(-\log \frac{I}{I_0}\right) = E. \tag{2}$$

Löst man die Gleichung nach c auf, so erhält man für die Konzentration

$$c = \frac{1}{K \cdot s} \cdot E. \tag{3}$$

Da die Extinktionskonstante und die Schichtdicke s bei Einhaltung der Arbeitsvorschrift immer gleich sind, so kann man auch

$$\frac{1}{K \cdot s} = f \tag{4}$$

schreiben. Durch die Einführung des Faktors f wird die Gleichung (3) sehr vereinfacht und heißt jetzt

$$c = f \cdot E. \tag{5}$$

Hieraus bestimmt man f leicht durch eine einzige Messung einer Lösung mit bekannter Konzentration und findet den Faktor

$$f = \frac{c}{E}, \tag{6}$$

der im vorliegenden Falle bei 5 ccm Endlösung für das Filter S 50 zu 22,21, für das Filter S 53 zu 35,67, bei 3 ccm Endlösung aber zu 13,327 bzw. zu 21,398 berechnet wurde.

Will man nun die Konzentration einer Farbstofflösung berechnen, so multipliziert man jeweils den entsprechenden Faktor f mit dem aus zweimal 5 Ablösungen bei Vertauschung der Küvetten mit den Filtern S 50 und S 53 gefundenen Mittelwert für die Extinktion E. Bei dieser Berechnung empfiehlt sich die Benutzung einer vierstelligen Logarithmentafel und die Verwendung des gefundenen vierstelligen Mittelwertes. Um den Prozentgehalt festzustellen, wird die so errechnete Farbstoffmenge in γ bei $^1/_2$ ccm Blut mit 200, bei 1 ccm Plasma mit 100 und bei 2 ccm Plasma mit 50 multipliziert.

Mit dieser Methode wurden Beleganalysen von Pr. S. in wässeriger Lösung, in Mischblut und Mischplasma (Diabetes, Oberschenkelbruch, Ikterus, Appendicitis, Mamma-Ca) ausgeführt, deren Werte aus der Tabelle 2 ersehen werden können.

Tabelle 2. Beleganalysen.

Vorgelegt γ	Prontosil solubile wiedergefunden in Wasser	Fehler %	Plasma	Fehler %	Blut	Fehler %
5	5,04	+ 0,8	5,00	0	4,98	— 0,4
10	9,95	— 0,5	10,02	+ 0,2	9,95	— 0,5
20	20,05	+ 0,3	20,1	+ 0,5	19,77	— 1,2
25	24,88	— 0,5	24,88	— 0,5	24,65	— 1,4
30	29,77	— 0,7	29,54	— 1,5	29,54	— 1,5

Die Abb. 16 gibt die typischen Farbkurven des im Wasser (Kurve 1 für 10 γ, Kurve 2 für 20 γ, Kurve 3 für 30 γ), Abb. 17 des im Mischplasma und Mischblut bestimmten Pr. S. für 20 γ wieder. Die Kurven zeigen dieselbe Form wie die Kurve 4 in Abb. 12, und die 20 γ-Kurven sind kongruent.

Damit dürfte bewiesen sein, daß die Bestimmung des Farbstoffs Pr. S. mit der angegebenen Methode unter den

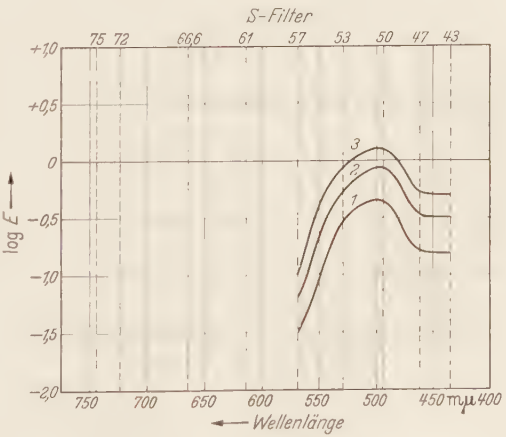


Abb. 16. Typische Farbkurven wässeriger Prontosil sol.-Lösungen nach Durchlauf des Analysenganges.

günstigsten Bedingungen ausgeführt werden kann, wofür auch die guten Analysenwerte sprechen.

Weitere Untersuchungen über den Nachweis und die Bestimmung von Prontosil sol. in anderen Körperflüssigkeiten werden durchgeführt.

Zusammenfassung.

1. Die chromatographische Adsorptionsanalyse wird in den Dienst der klinisch-chemischen Untersuchungsmethodik gestellt.

2. Es wird eine Arbeitsweise beschrieben, die es gestattet, kleinste Mengen Prontosil sol. quantitativ aus Plasma und Vollblut zum Zwecke ihrer stufenphotometrischen Bestimmung zu isolieren. Dies wird durch die kombinierte, getrennte Anwendung zweier Adsorptionsmittel (Talk, Frankonit KL) unter Verhütung der Gerinnung und Umgehung der Enteiweißung durch Ausfällung, ohne Anwendung von organischen Lösungsmitteln, lediglich durch planmäßig geleitete Adsorption und Elution in saurem oder alkalischem wässerigem Milieu erreicht. Nachweisgrenze 0,04 γ Pr. S. in $^1/_2$ ccm Blut oder 1—2 ccm Plasma. Fehler der Bestimmung um 1 %. Analysendauer ungefähr 40—45 Min.

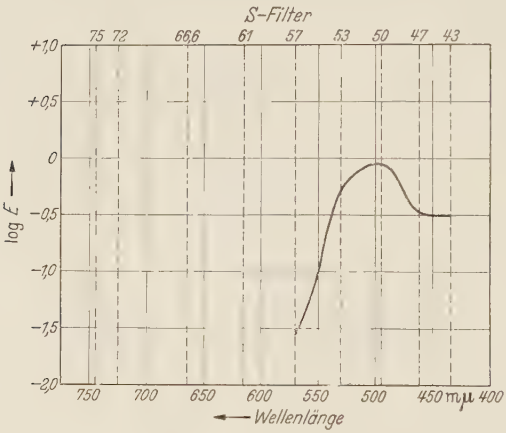


Abb. 17. Typische Farbkurven des Prontosil sol. nach seiner Isolierung aus Mischplasma und Mischblut.

3. Die Lichtabsorption von Prontosil sol. wird an Hand von sogenannten typischen Farbkurven erörtert.

4. Die Fehlerquellen der bisher verwendeten Methode zur Bestimmung des Prontosil sol. im Serum werden untersucht, aufgeklärt und ausgeschaltet.

5. Die Möglichkeit der Bestimmung anderer Farbstoffe in Körperflüssigkeiten mit grundsätzlich derselben Arbeitsweise bei sinngemäßer Abwandlung und Kombination der Adsorptionsmittel wird erwähnt.

6. Auf die Prontosil sol.-Adsorption an die Serumkolloide und ausgefälltes Eiweiß und die Bedeutung der auf physikalisch-chemischem Wege erreichten Abtrennung des Prontosil sol. von den Kolloiden für die Art der Farbstoffbindung an die Kolloide wird hingewiesen.

7. Der Wirkungsmechanismus des Prontosil sol. wird unter einem neuen Gesichtswinkel betrachtet. Dabei wird es für möglich gehalten, daß die Adsorption der Verbindungen der Prontosilgruppe an die Bakterien-

toxine eine Veränderung der Toxinbindung im Organismus bewirkt, die Adsorption des Prontosil sol. an die Strukturen des Organeiweißes die Toxinbindung im Gewebe verhindert oder eine spezifische Schädigung der Bakterien dadurch hervorgerufen wird, daß der Farbstoff an Stoffwechselprodukte adsorbiert und in die Bakterienleiber eingeschleppt wird.

Literatur.

1) Kingreen, O.: Bruns' Beitr. **166**, 629 (1937). — 2) Bayer, Leverkusen: „Prontosil" (blaue u. gelbe Broschüre). — 3) Jauerneck, A., u. W. Gueffroy: Klin. Wschr. **1937**, S. 1544. — 4) Labes, R., u. Fr. Billmann: Biochem. Z. **274**, 75 (1934). — 5) Soehring, K.: Ebenda **295**, 265 (1937). — 6) Domagk, G.: Klin. Wschr. **1936**, S. 1585. — 7) Levaditi u. Vaisman: Presse méd. **1935**, S. 2097. — 8) Zechmeister, L., u. L. v. Cholnoky: Die chromatographische Adsorptionsmethode. Wien, Jul. Springer, 1937.

Aus dem Erbwissenschaftlichen Forschungsinstitut des Reichsgesundheitsamtes, Berlin-Dahlem. (Leiter: Professor Dr. Günther Just.)

Über die individuelle Empfindlichkeit von Lebistes reticulatus gegenüber Nikotinlösungen verschiedener Konzentrationen.

Von

E. Schuster-Woldan.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Oktober 1939.)

Einleitung.

In meinen früheren Mitteilungen (1), die über Wirkungen von Nikotin auf Lebistes reticulatus berichten, wurde besonders darauf hingewiesen, daß die Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber Nikotinlösungen sehr großen individuellen Schwankungen unterworfen ist. Selbst unter Berücksichtigung des Faktors, daß das in unseren Versuchen verwendete Tiermaterial nicht homozygot war, schien die Empfindlichkeit der einzelnen Tiere doch so auffällig schwankend, daß es insbesondere in Hinsicht auf weitere Arbeiten gegeben erschien, über diese Frage noch umfangreichere Untersuchungen anzustellen.

Wir haben unter Berücksichtigung der Abstammungsverhältnisse, des Geschlechts und der Gewichtsverhältnisse der einzelnen Tiere das Verhalten von Lebistes gegenüber Nikotinlösungen verschiedener Konzentration in bezug auf ein bestimmtes Vergiftungssymptom geprüft.

Methodisches.

Wir verwandten für die vorliegenden Versuche geschlechtsreife Männchen und Weibchen; die Weibchen waren unbefruchtet. Das Medium, in dem die Tiere gehalten wurden, bestand lediglich aus einer Mischung von abgestandenem Leitungswasser mit reinem Nikotin. Die durchschnittliche Temperatur war 21° C. Die Konzentrationen betrugen 1 : 100000, 1 : 200000 und 1 : 300000. Diese Konzentrationen sind bis zu einem gewissen Grade willkürlich gewählt, jedoch unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Nikotinlösungen stärkerer Konzentration als 1 : 100000 auf diese Fischart fast augenblicklich tödlich wirken.

Das Gewicht der Tiere wurde vor Versuchsbeginn und am Ende des Versuchs, jeweils nach Einschaltung von 4 Tagen ohne Fütterung, festgestellt; die Fische wurden in kleinen Behältern mit Wasser gewogen.

Die Versuchstiere stellten kein homozygotes Material dar, jedoch handelte es sich insofern um ziemlich ausgeglichenes Material als die Tiere, die für die Versuchsreihen einer bestimmten Konzentration genommen wurden, aus einem Wurf stammten und die dritte Inzucht darstellten. Sämtliche Tiere sind unter den

gleichen Bedingungen in bezug auf Raum, Temperatur, Wasserverhältnisse, Fütterung usw. herangezüchtet und werden während bzw. nach dem Versuch unter gleichen äußeren Bedingungen gehalten.

Die Reaktion des Wassers wurde lediglich kolorimetrisch (nach Szensny) kontrolliert; p_H-Schwankungen waren während des Versuchs nicht festzustellen.

Die Versuchstiere wurden in den jeweiligen Lösungen solange belassen, bis bestimmte Vergiftungssymptome auftraten. Alsdann wurden sie sofort in Frischwasser gebracht, wo sie sich meist schon nach einigen Minuten völlig erholten. Im Frischwasser verblieben die Tiere bis zur Wiederholung des Versuchs am folgenden Tage, also meistens nur wenig unter 24 Stunden. Die Kontrolltiere wurden ebenfalls gleichzeitig, d. h. zweimal am Tage, mit umgesetzt.

Wir legten als „Empfindlichkeitswert" den Punkt fest, da das Versuchstier unbeweglich mit der charakteristischen Flossenstarre in der Nikotinlösung auf den Boden des Gefäßes sinkt. Kurvenmäßig stellt sich eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der jeweiligen Nikotinlösung als höher gelegener Punkt dar, also als höhere Resistenzfähigkeit.

Besprechung der Versuche.

Für einen Versuch mit einer Nikotinlösung von der Konzentration 1 : 100000 verwandten wir ausschließlich Männchen. Es handelt sich um geschlechtsreife, mit voll entwickelten sekundären Geschlechtsmerkmalen versehene Tiere gleicher Abstammung und gleichen Alters. Das Gewicht lag zu Versuchsbeginn zwischen 0.09 und 0.14 g. Wir teilten die Tiere in zwei Gruppen. Gruppe 1 enthielt die Tiere mit den Gewichtsgrenzen 0,09—0,10 g, Gruppe 2: 0,11—0,14 g. In Abb. 1 wird das Verhalten der Gruppe 1 durch starke Linien, das der Gruppe 2 durch schwache Linien wiedergegeben. Die Versuche erstreckten sich auf einen Zeitraum von 15 Tagen: am 7. und am 13. Versuchstag wurden die Tiere nicht mit der Nikotinlösung in Berührung gebracht, so daß sich eine absolute Behandlungszeit von 13 Tagen ergibt. Am Ende dieser Zeit war weder bei den nikotinbehandelten Tieren noch bei den Kontrollen eine augenfällige Veränderung in dem Verhalten der Tiere zu beobachten.

Wir haben in den kurvenmäßigen Darstellungen, wie erwähnt, die Zeitpunkte an den einzelnen Tagen festgelegt, wo die Versuchstiere mit typischen Vergiftungssymptomen auf den Boden des Versuchsgefäßes sinken.

Aus dem überschneidenden Verlauf der einzelnen Kurven ergibt sich, daß bei einer Nikotinlösung von der Konzentration 1 : 100000 weder eine besondere individuelle Empfindlichkeit der einzelnen Tiere noch eine Beziehung zwischen Körpergewicht und Empfindlichkeit innerhalb bestimmter Gewichtsgrenzen zu erkennen ist. Während der ganzen Versuchszeit überschreitet lediglich in einem Falle, und zwar am 12. Tage, die Kurve eines Versuchstieres der Gruppe 1 die 10-Minutenlinie. Die übrigen Werte halten sich insgesamt zwischen minimal 1 Minute und maximal 9 Minuten Reaktionsempfindlichkeit. Eine markante Veränderung in der Empfindlichkeit gegenüber dieser Nikotinlösung ergibt sich auch nicht nach

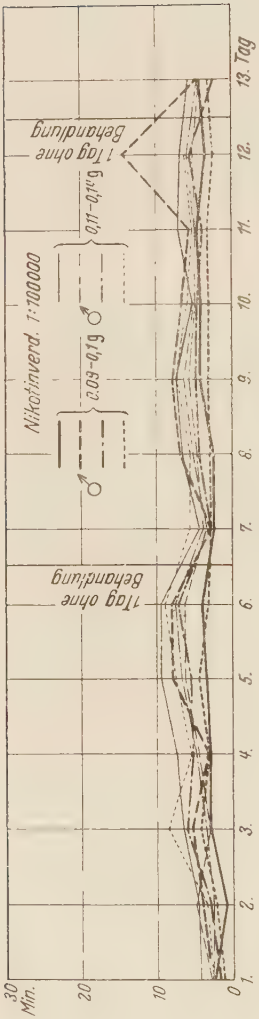


Abb. 1.

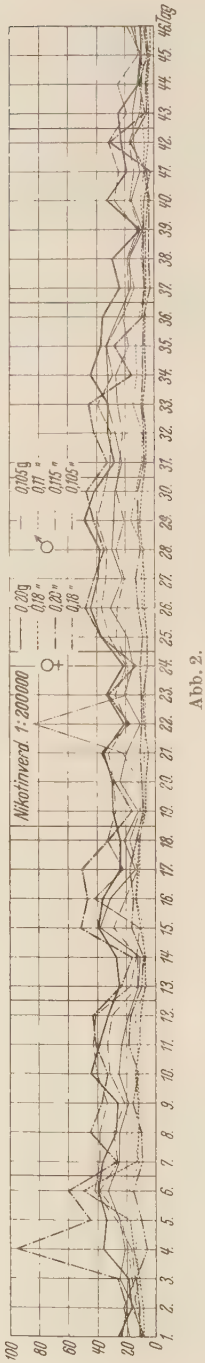


Abb. 2.

Einschaltung eines behandlungsfreien Tages. Die durchschnittlichen Werte liegen für die gesamte Beobachtungszeit bei 4 Minuten.

Im weiteren überprüften wir das Verhalten der Fische in einer Nikotinlösung von der Konzentration 1 : 200000. Die in Abb. 2 wiedergegebenen Versuchsergebnisse erstrecken sich über eine Versuchsdauer von 46 Tagen. Die schwachen Linien beziehen sich auf die männlichen, die starken Linien auf die weiblichen Tiere. Die Männchen wurden wie alle übrigen Versuchstiere nach Einschaltung einer Hungerzeit von 4 Tagen gewogen; ihr Gewicht betrug: Männchen: 2 Tiere = 0.105g, 1 Tier = 0,11 g, 1 Tier = 0,115 g; Weibchen: 2 Tiere = 0,2 g, 2 Tiere = 0,18 g. Die Kurven von Weibchen Nr. 2 und 4 (= 0,18 g), sowie die von Männchen Nr. 2 (0,11 g) verlaufen relativ geradlinig parallel zur Abszisse, d. h. die Empfindlichkeit dieser 3 Tiere gegenüber der Nikotinlösung war an den einzelnen Versuchstagen nicht wesentlich verschieden und überschritt den Wert von 20 Minuten nicht. Abweichend verhalten sich die Weibchen Nr. 1 (0,20 g) und Nr. 3.

und Männchen Nr. 1 (0,105 g), Nr. 3 (0,11 g) und Nr. 4 (0,105 g). Der Kurvenverlauf dieser 5 Versuchstiere ergibt wohl verschiedene Schnittpunkte mit den Kurven der erstgenannten Tiere, jedoch sind bei der zweiten Gruppe sowohl größere Amplituden als auch durchschnittlich niedrigere Empfindlichkeitswerte festzustellen. Die Amplituden sind zu Versuchsbeginn weitaus markanter als am Ende. Ebenso nähern sich alle Tiere in bezug auf die Empfindlichkeit zu Versuchsende immer mehr einer gemeinsamen Linie.

Diese Beobachtung tritt noch markanter in Erscheinung, wenn wir bei sonst gleicher Versuchsanordnung, jedoch mit einer Nikotinlösung von der Konzentration 1 : 300000 arbeiten. Das Gewicht der vier Weibchen (Nr. 1 bis 4) betrug bei Versuchsbeginn je 0,16 g, das der vier Männchen: Nr. 1 = 0,140 g, Nr. 2 = 0,130 g, Nr. 3 = 0,105 g, Nr. 4 = 0,100 g.

Der Verlauf der Kurven der acht Versuchstiere (Abb. 3) ist im ersten Drittel der Versuchszeit weitaus größeren Schwankungen unterworfen als in den letzten zwei Dritteln. Von einem parallelen Verlauf der einzelnen Kurven ist in keinem Falle zu sprechen. Überschneidungen finden im gleichen bzw. in stärkerem Maße als in den Versuchen mit der Lösung 1 : 200000 statt, d. h. die Empfindlichkeit der einzelnen Tiere ist an den verschiedenen Tagen verschieden groß. Das Ansteigen bzw. das Abfallen der Werte erfolgt an den jeweiligen Tagen nicht gleichmäßig, sondern in scheinbar völliger Regellosigkeit. Bei einer bestimmten Anzahl von Tieren liegt der Wert an einem Tage bedeutend höher oder tiefer als an den vorhergehenden Tagen, bei den anderen Tieren verhält es sich genau entgegengesetzt. Eine gewisse Einheitlichkeit, d. h. Parallelverlaufen bzw. Absinken der Werte auf einen gemeinsamen Nenner am Ende der siebenten Versuchswoche, ist allerdings deutlich zu erkennen.

Die Kurve des Männchens 1 (0,14 g) erreicht, von minimalen Abweichungen abgesehen, durchweg die höchsten Werte. Die maximale Schwankung von einem Tag zum anderen beträgt 800%; die Differenz zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert innerhalb der gesamten Versuchszeit 1050%. Die Kurve des Männchens Nr. 2, das gewichtsmäßig dem Männchen Nr. 1 am nächsten steht (0,130 g), ergibt nach anfänglich ebenfalls erheblichen Schwankungen innerhalb dieser Versuchsgruppe fast eine Gerade, die die tiefsten Werte sämtlicher Tiere dieses Versuchs darstellt. Die beiden anderen Männchen (Nr. 3 = 0,105 g und Nr. 4 = 0,100 g) ergeben trotz ihres bedeutend niedrigeren Körpergewichts zwei Kurven, die durchweg aus höheren Werten resultieren als diejenige von Männchen Nr. 2.

Was den Verlauf der Reaktionskurve der Weibchen Nr. 1 bis 4 (0,160 g) anbetrifft, so liegen dieselben, allgemein gesprochen, zwischen den Kurven der männlichen Tiere. Während auch hier die Schwankungen innerhalb der ersten 2 Wochen des Versuchs am deutlichsten sind, verlaufen die Werte aller Weibchen während der letzten 10 Versuchstage fast in einer gemeinsamen Linie. Die makanten Schwankungen, wie wir sie innerhalb der ersten 14 Tage des Versuchs beobachteten, kehren danach in diesem Maße nicht wieder; sie erreichen auch nie die absoluten Maximalwerte der Männchen. Trotzdem beträgt die Differenz zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert bei dem gleichen Tier 1800%.

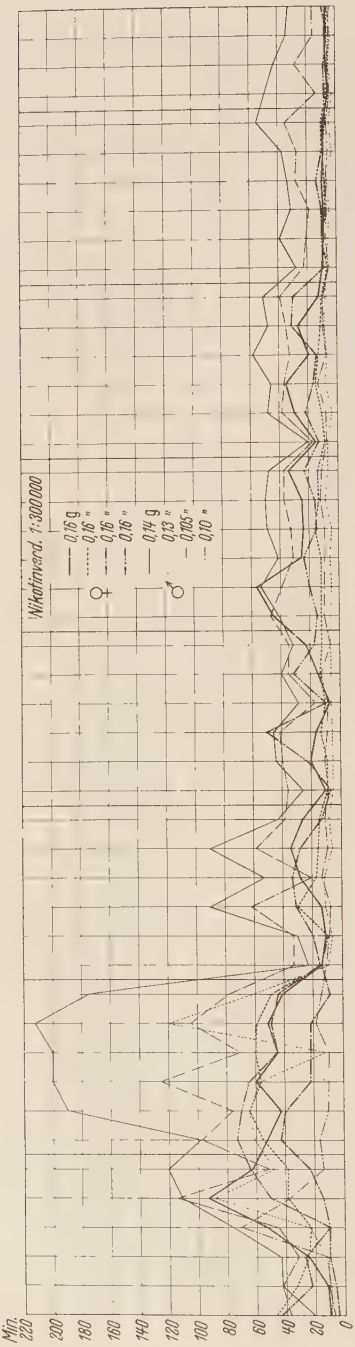

Nikotinverd. 1:3000000
0,16 g
0,16 "
0,16 "
0,16 "
0,14 g
0,13 "
0,105 "
0,10 "
♀
♂
Min.
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0

Abb. 3.

7 Tage Pause
Nikotinverd. 1:200000
Gruppe I
Gruppe II
Min.
50
40
30
20
10
0
1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.
8.
9.
10.
11.
12.
13.
14.
15.
16.
17.
18.
19.
20.
21.
22.
23.
24.
25.
26.
27.
28.
29.
30. Tag

Abb. 4.

In den bisher besprochenen Versuchen trat die individuelle Empfindlichkeit der Versuchstiere zu Anfang der Nikotinbehandlung besonders auffällig zutage. In weiteren Versuchen, die unter den gleichen technischen Bedingungen wie die bereits beschriebenen durchgeführt wurden, waren folgende Abänderungen getroffen: a) es wurde ein anderer Stamm verwendet, b) es wurden lediglich Männchen in den Versuch genommen, und c) es wurde nicht wie bisher nur ein behandlungsfreier Tag eingeschaltet, sondern nach dem 19. Versuchstag eine Ruheperiode von 7 Tagen; dies geschah sowohl im Versuch mit der Lösung 1 : 200000 als auch gleichzeitig mit 1 : 300000. Wir wollten hierbei feststellen, ob hierdurch eine wesentliche Veränderung der bis dahin beobachteten Empfindlichkeit eintritt.

Zu Abb. 4. Die Konzentration beträgt 1 : 200000, das Gewicht der Männchengruppe I (starke Linien) 0,09 0,1 g, Gruppe II (schwache Linien) 0,11 bis 0,14 g. Die „Amplituden" um den Durchschnittswert sind auch hier in der ersten Hälfte bzw. zwei Drittel des Versuchs viel deutlicher, während gegen Ende des Versuchs die Annäherung an einen mittleren Wert zu beobachten ist. Es läßt sich weiter feststellen, daß ein behandlungsfreier Tag die Empfindlichkeit am folgenden Tage nicht wesentlich verändert. Auch die Einschaltung der „Ruhepause" von 7 Tagen am 19. Versuchstage bedeutet in bezug auf die Empfindlichkeitswerte insofern keine Veränderung, als fast genau die gleichen Werte am 27. (20.) Versuchstage zu finden sind wie am 19.

Fast das gleiche Bild, nur mit jeweils größeren Amplituden, finden wir im Versuch 5 mit der Konzentration 1 : 300000 (Abb. 5). Das Gewicht der Männchen beträgt hier ebenfalls: Gruppe I 0,09 0,10 g (starke Linien); Gruppe II 0,11—0,14 g (schwache Linien).

Die Amplitude der individuellen Empfindlichkeit schwankt hier z. B. bei zwei Tieren am 10. Versuchstage noch um rund 800%, d. h. der Empfindlichkeitswert von Tier Nr. 1 liegt an diesem Tage bei 21 Minuten, von Tier Nr. 2 bei 160 Minuten. Am folgenden Tage verhalten sich die Tiere genau umgekehrt. Tier Nr. 1 zeigt den Wert von 150 Minuten, Tier Nr. 2 von 27 Minuten.

Am Ende des Versuchs ist eine Annäherung auf einen Durchschnittswert festzustellen. Die Einschaltung von 7 behandlungsfreien Tagen nach dem 19. Versuchstag scheint ohne wesentlichen Einfluß auf die Empfindlichkeit zu sein. Errechnet man die „Durchschnittsempfindlichkeit", d. h. Summe der einzelnen Empfindlichkeitswerte dividiert durch die Anzahl der Versuchstage, so ergeben sich die in Tabelle 1 wiedergegebenen Werte. Es ist in Reihe 1 zunächst besonders auffällig, daß eine Parallele zwischen bestimmten Körpergewichten und der durchschnittlichen Empfindlichkeit zu bestehen scheint. Die beiden Weibchen mit dem Körpergewicht von 0,20 g besitzen die durchschnittliche Empfindlichkeit von 29,9 und 29,7 Minuten. Die Weibchen mit den Gewichten von 0,18 g weisen eine durchschnittliche Empfindlichkeit von 9,3 und 9,6 Minuten

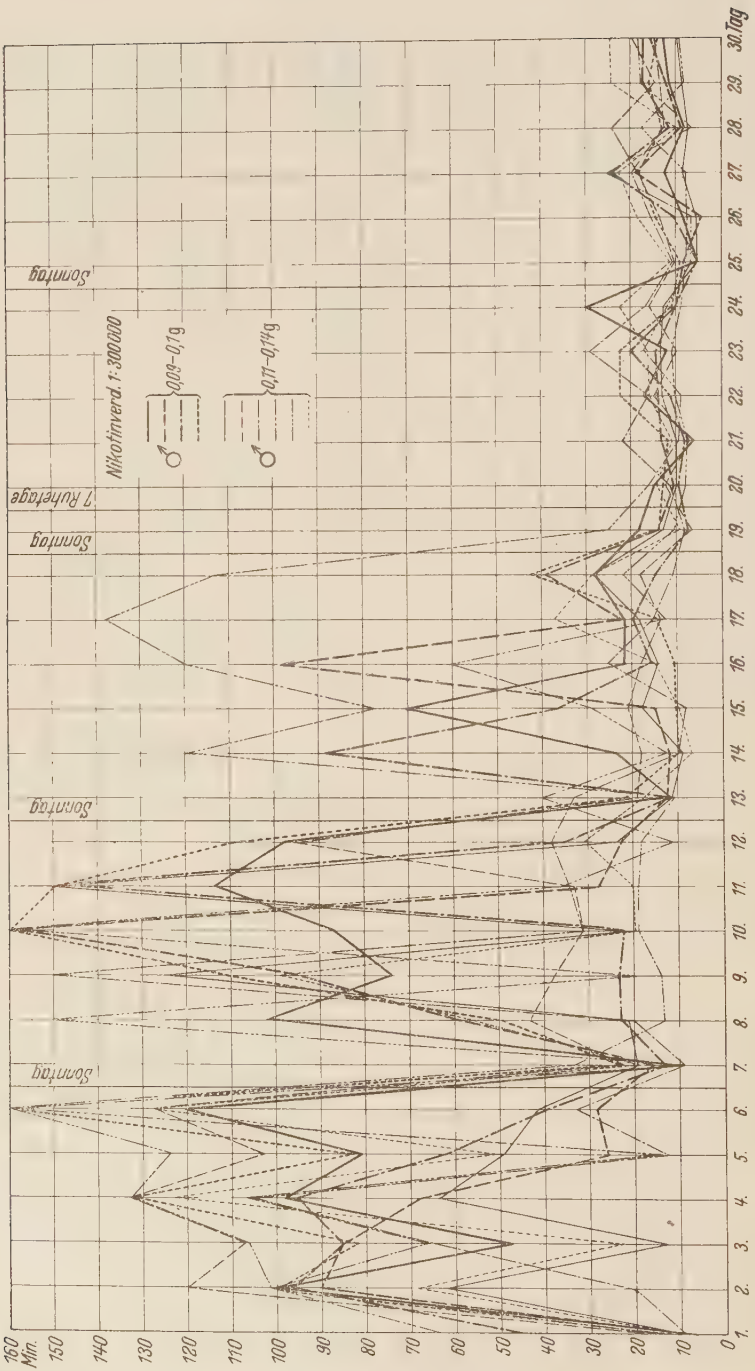

Min.
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. Tag
Sonntag
Sonntag
Sonntag
7 Ruhetage
Sonntag
Nikotinverd 1:300000
♂ 0,09–0,1 g
♂ 0,11–0,14 g

Abb. 5.

Tabelle 1. Durchschnittsempfindlichkeit.
1 : 200 000.

1.	2.
♀ 1 = 20,9′ (0,20 g)	♂ 1 = 20,86′ (0,105 g)
♀ 2 = 9,3′ (0,18 g)	♂ 2 = 10,36′ (0,110 g)
♀ 3 = 29,7′ (0,20 g)	♂ 3 = 27,60′ (0,115 g)
♀ 4 = 9,6′ (0,18 g)	♂ 4 = 21,45′ (0,105 g)
Gesamtwert: 19,6′	Gesamtwert: 20,6′

Tabelle 2. Durchschnittsempfindlichkeit.
1 : 200 000.

1.	2.
♀ 1 = 26,3′ (0,16 g)	♂ 1 = 65,16′ (0,14 g)
♀ 2 = 20,7′ (0,16 g)	♂ 2 = 17,4′ (0,13 g)
♀ 3 = 18,8′ (0,16 g)	♂ 3 = 43,16′ (0,10 g)
♀ 4 = 25,8′ (0,16 g)	♂ 4 = 12,07′ (0,10 g)
Gesamtwert: 23′	Gesamtwert: 34,45′

auf. In Reihe 2 finden wir bei den männlichen Tieren insofern ebenfalls ein ähnliches Ergebnis, als die Werte von Tier Nr. 1 und 4, die beide das Gewicht 0,105 g besitzen, eine durchschnittliche Empfindlichkeit von 20,8 und 21,4 ergeben. Auch Tier Nr. 3 mit seinem höheren Gewicht von 0,115 g weist eine höhere Empfindlichkeit auf. Jedoch liegt der Wert von Männchen Nr. 2 mit einem Gewicht von 0,110 g um etwa 50 % niedriger als der von Tier Nr. 1 und 2 mit den Gewichten von 0,105 g. Noch wesentlichere Abweichungen erkennen wir in Tabelle 2. Hier läßt sich in keiner Weise eine Übereinstimmung zwischen Körpergewicht und durchschnittlicher Empfindlichkeit konstatieren, ja die Empfindlichkeitswerte der beiden gleichgewichtigen Tiere Nr. 3 und 4 liegen um rund das Vierfache

Tabelle 3.

♀			♂		
Gewicht vor dem Versuch g	Gewicht nach dem Versuch g	Differenz g	Gewicht vor dem Versuch g	Gewicht nach dem Versuch g	Differenz g
1 : 200 000.					
0,165	0,255	+ 0,090	0,140	0,085	— 0,055
0,160	0,230	+ 0,070	0,130	0,100	— 0,030
0,160	0,210	+ 0,050	0,105	0,105	± 0
0,160	0,220	+ 0,060	0,100	0,100	± 0
1 : 300 000					
0,200	0,280	+ 0,080	0,105	0,100	0,005
0,185	0,235	+ 0,050	0,110	0,150	+ 0,040
0,200	†		0,115	0,150	+ 0,035
0,185	0,210	+ 0,025	0,105	0,110	+ 0,05
Kontrolle					
0,400	0,400	± 0	0,120	0,120	± 0
0,450	0,500	+ 0,05	0,120	0,125	+ 0,005

auseinander. Diesen Befunden stehen die Werte der männlichen Tiere in Rubrik 1 wieder mit einer gewissen Ausgeglichenheit gegenüber. Die Spanne bei den gleichgewichtigen Tieren beträgt maximal nicht einmal 50 %.

Wenn auch das Versuchsmaterial im vorliegenden Falle sehr gering ist, so sind doch die Befunde so charakteristisch, daß ein Schluß, es bestehe bei einem ausgeglichenen Versuchsmaterial eine klare Beziehung zwischen Körpergewicht und Empfindlichkeit, nicht gezogen werden kann. Es tritt vielmehr eine individuelle, in noch unbekannten Faktoren begründete Empfindlichkeit in Erscheinung.

Literatur.

[1]) Schuster-Woldan, E.: Über Nikotinwirkungen auf Lebistes reticulatus. Roux' Arch. f. Entwicklungsmechanik d. Organismen **138**, Heft 3/4 (1938). — Schuster-Woldan, E.: Über die Wirkung von Nikotin auf die Fortpflanzungsfähigkeit von Lebistesweibchen. Arch. f. Gynäkol. **168**, Heft 2 (1939).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Oxalatwirkung und Calcium*.

Von

Norbert Brock, H. Druckrey und H. Herken.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. November 1939.)

Bei unseren Untersuchungen[1] über den Stoffwechsel isolierter Gewebe benutzten wir das Oxalat als ein Mittel, die „Glykolyse" zu vergiften. Dabei interessierte uns besonders die Frage, wieweit diese Wirkung auf die eintretende Calciumfällung, also auf den Entzug von Calcium zu beziehen ist.

Die Hemmung der Milchsäurebildung in Geweben, z. B. im Muskel, durch Oxalat[2] wird nach gesicherten Ergebnissen dadurch verursacht, daß unter der Einwirkung des Oxalats im Glykogenabbau schwer spaltbare Ester angehäuft werden[3], und zwar greift das Oxalat schon beim Übergang nicht reduzierender in reduzierende Kohlenhydrate, also sehr weit oben in den Glykogenabbau ein[4]. Diese Wirkung des Oxalats wird mit guten Gründen auf einen Angriff am Ferment selbst zurückgeführt, denn sie ist auch in zellfreien Gewebsextrakten unverändert nachweisbar. Diese Tatsache schließt neben anderen - - von vornherein die Möglichkeit aus, daß die Wirkung des Oxalats auf die Glykogenolyse an Gewebsschnitten durch eine „abdichtende" Wirkung des Oxalats bedingt ist. Wahrscheinlich greift das Oxalat am Ferment selbst an und führt es durch Komplexbildung in ein inaktives Produkt über[5].

Bei diesen biochemischen Untersuchungen sind die zahlreichen pharmakologischen Arbeiten über die Wirkung des Oxalats auf den Organismus und auf isolierte Organe praktisch unberücksichtigt geblieben und damit die oben aufgeworfene Frage, ob bei der Oxalatwirkung auf die Glykolyse die Ausfällung von Calcium irgendwie beteiligt ist. Die pharmakologischen Arbeiten auf der anderen Seite lassen die Stoffwechselwirkung des Oxalats unberücksichtigt und beschränken sich im wesentlichen auf die Untersuchung der Oxalatwirkung auf die Herzfunktion, besonders am isolierten Froschherzen. Hierzu kommen Untersuchungen über die Toxizität am ganzen Tier.

*) Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

[1] Brock, N., H. Druckrey u. H. Herken: Biochem. Z. **300**, 1 (1938); H. Herken: Arch. exper. Zellforsch. **22**, 626 (1939). — [2] Meyerhof, O.: Pflügers Arch. **188**, 114 (1921). — [3] Lohmann, K.: Biochem. Z. **222**, 324 (1930). — [4] Haarmann: Ebenda **256**, 350 (1932). — [5] Dickens u. Simer: Biochem. J. (Brit.) **23**, 936 (1929).

Da das Oxalat Calcium ausfällt und das Herz ebenso stillstellt[6] wie ein Calciumentzug, wird die Giftigkeit des Oxalats am Herzen im allgemeinen auf seine kalkfällende Wirkung bezogen[7, 8]; dies um so mehr, als das oxalatvergiftete Herz durch Calciumzusatz wieder zum Schlagen gebracht werden kann, nicht aber durch einfaches Auswaschen mit calciumfreier Lösung[8]. Gegen diese Auffassung wendet sich Gros[9] auf Grund der Beobachtung, daß sich das oxalatvergiftete Herz nach Durchspülen mit bicarbonathaltiger Kochsalzlösung ohne Calcium wieder erholt. Das gleiche wurde für calciumfreie Lösungen gefunden, die Nicht-Elektrolyte enthielten[10]. Damit gewinnt auch der zuerst von Januschke[8] erhobene Befund wieder an Gewicht, daß nämlich Fluorid am Froschherzen weitgehend ungiftig ist, obwohl es ebenso Calcium fällt wie Oxalat.

Ähnlich zwiespältig sind die Ergebnisse toxikologischer Versuche. Trendelenburg und Goebel[11] vertreten die Meinung, Oxalat wirke tödlich, weil es das lebenswichtige Calcium fällt, dies um so mehr, als bei Oxalatvergiftung tetanieartige Symptome auftreten und das ausgefallene Calciumoxalat in den Nierenkanälchen sichtbar vorgefunden wird. Auf der anderen Seite deuten aber die Befunde, daß bei einer Oxalatvergiftung ein noch weit stärkerer Kaliumverlust stattfindet[12], daß ferner zwischen der Wirkung des Oxalats am ganzen Tier und dem auftretenden Calciumentzug keine quantitativen Beziehungen zu bestehen brauchen[13], und schließlich daß selbst intravenöse Injektion von Calciumchlorid den Eintritt des Todes bei oxalatvergifteten Kaninchen nicht verhindern kann[14], darauf hin, daß bei der Oxalatvergiftung neben dem Entzug von Calcium noch andere Dinge im Spiel sein müssen. Auch die toxische Wirkung des Oxalats und anderer Dicarbonsäuren auf die Nieren[15], die zunächst auch auf Entzug von Calcium bezogen wurde[16], ist sicher wenigstens zum Teil anders bedingt, denn die Giftigkeit der verschiedenen Dicarbonsäuren geht ihrem Vermögen, Calcium zu fällen, keineswegs parallel[17]. Schließlich wurden auch auf dem Gebiet der Blutgerinnungsforschung Bedenken gegen die einseitige Auffassung der Oxalatwirkung als Calciumentzug laut, vor allem als sich zeigte, daß zur Hemmung der Gerinnung etwa 6—100mal mehr Oxalat notwendig ist, als Calcium vorhanden ist, und daß die Menge des erforderlichen Oxalats mehr von dem vorhandenen Thrombingehalt

[6] Koch, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **14**, 153 (1861). — [7] Z. B. Starkenstein, E.: Lehrbuch der Pharmakologie. Leipzig und Wien 1938. — [8] Januschke, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **61**, 363 (1909). — [9] Gros, O.: Ebenda **71**, 395 (1913). — [10] Loewi, O.: Pflügers Arch. **187**, 105 (1921). — [11] Trendelenburg, P., u. W. Goebel: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **88**, 171 (1920). — [12] Luithlen, F.: Ebenda **68**, 209, (1912); **69**, 365 (1912); E. Stransky: Biochem. Z. **221**, 74 (1930). — [13] Jodlbauer, A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **164**, 464 (1932). — [14] Fröhlich, A., u. R. Gussenbauer. Ebenda **97**, 61 (1923); S. Hermann: Ebenda **176**, 591 (1934). — [15] Underhill, F. P.: J. biol. Chem. (Am.) **12**, 115 (1912). — [16] Umeda, N., u. A. J. Ringer: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **14**, 33 (1916). — [17] Salant, W.: J. Pharmacol. (Am.) **11**, 133 (1918); W. C. Rose: Ebenda **24**, 123, 146 (1925).

abhängig ist als vom Calciumgehalt[18]. Einige solcher Gesichspunkte veranlaßten auch Pohl[19] in seiner zusammenfassenden Darstellung, nicht der verbreiteten Meinung, daß das Oxalat durch Calciumentzug giftig wirke, uneingeschränkt zu folgen, sondern im Gegenteil eigene Giftwirkungen des Oxalats für wahrscheinlich zu halten. Er stellt in diesem Zusammenhang besonders heraus, daß bei Injektion in die Vena jugularis beim Kaninchen wenige Zentigramme Oxalat, für deren Bindung nur eine geringe Menge des vorhandenen Calciums nötig ist, genügen, um tödlich zu wirken.

Es ist bemerkenswert, daß die biochemischen Untersuchungen in den pharmakologischen Arbeiten über das Oxalat ebenso unberücksichtigt bleiben, wie die pharmakologischen Untersuchungen in den biochemischen Arbeiten. Das ist ein bedauerliches Beispiel für das Fehlen ausreichender Verbindungen zwischen verschiedenen Forschungsrichtungen. Die spezielle Giftwirkung des Oxalats auf glykolytische Prozesse muß indessen auch bei seiner pharmakologischen und toxikologischen Wirkung eine Rolle spielen, weil die Spaltprozesse im Kohlenhydratstoffwechsel von grundlegender Bedeutung für den Organismus sind. Wir haben deshalb an einigen Beispielen die Giftwirkung des Oxalats auf „glykolytische" Prozesse unter dem besonderen Gesichtspunkt des eintretenden Calciumentzuges untersucht.

Als Methode diente uns die von Warburg[20] angegebene „indirekte" Messung des Stoffwechsels von Gewebsschnitten, die wir an anderer Stelle ausführlich beschrieben haben[21]. Für die Untersuchung kamen nur solche Gewebe in Frage, bei denen glykolytische Prozesse nachweisbar sind. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die sogenannte „aerobe Glykolyse" keine einheitliche Stoffwechselqualität darstellt, sondern von Fall zu Fall verschieden ist[22] und sich je nach ihrer Natur auch gerade gegen Oxalat verschieden verhält. Nicht empfindlich gegen Oxalat ist z. B. die „aerobe Glykolyse" bösartiger Gewebe, von Hoden und von Gehirn, empfindlich ist dagegen die Glykogenolyse.

Wir haben in früheren Versuchen[21] festgestellt, daß Leberschnitte im Anfang des Stoffwechselversuchs regelmäßig eine meist sogar beträchtliche Glykogenolyse zeigen (Abb. 1, Kurve 1), die nach 1—2 Stunden erst wieder verschwindet und auf eine Schädigung der Leber durch die methodisch notwendigen Eingriffe bezogen werden kann. Diese Glykogenolyse wird durch Oxalat zum Verschwinden gebracht[1, 22]. Aus diesem Grunde haben wir unsere Versuche an Gewebsschnitten der Rattenleber vorgenommen. Als Suspensionsflüssigkeit benutzten wir dabei

[18] Vines, H. W. C.: J. Physiol. (Brit.) **55**, 86 (1921); H. Scheuring: Biochem. Z. **277**, 437 (1935). — [19] Pohl, J.: Handb. exper. Pharmak. **1**, 860 (1923). — [20] Warburg, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926; O. Warburg, Kubowitz u. Christian: Biochem. Z. **242**, 170 (1931). — [21] Druckrey, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **180**, 231 (1936). — [22] Brock, N., H. Druckrey u. H. Herken: Biochem. Z. **300**, 1 (1938).

zuckerfreie Ringerlösung, weil stark geschädigte Leber neben der Glykogenolyse auch eine „echte" Glykolyse zeigen kann [22], bei der also nicht zelleigenes Kohlenhydrat gespalten wird, sondern die Glykose der Ringerlösung wie bei Tumorgeweben. Diese „echte" Glykolyse ist oxalatresistent und könnte deshalb stören.

Wir haben nun untersucht, ob das Verschwinden der Glykogenolyse bei Lebergewebe unter der Einwirkung von Oxalat durch den Entzug

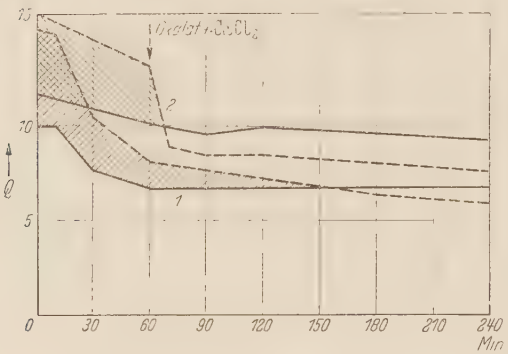


Abb. 1. Gewebsschnitte der normalen Rattenleber zeigen in den ersten Stunden des Versuches eine Glykogenolyse (Kurve 1, schraffiertes Feld). Auf Zusatz von Oxalat (Pfeil) verschwindet die Glykogenolyse auch dann, wenn gleichzeitig eine äquivalente Menge Calcium zugegeben wurde (Kurve 2). Durchgezogene Linie = Sauerstoffverbrauch in cmm pro mg Trockensubstanz und Stunde; gestrichelte Linie = Gesamt-CO_2-Bildung; schraffiertes Feld = „Extra-Kohlensäure", Glykogenolyse.

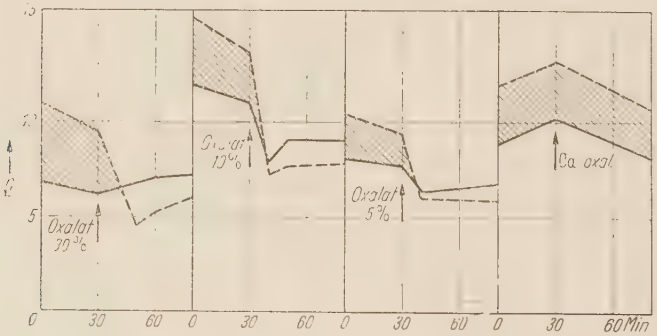


Abb. 2. Wirkung geringer Oxalatdosen, die nur einem Teil (in Prozenten) des vorhandenen Calciums äquivalent sind, auf die Glykogenolyse (Kurve 1—3). Gefälltes Calciumoxalat ist ohne Wirkung (Kurve 4). (Erklärung wie Abb. 1.)

von Calcium bedingt ist. Zu diesem Zweck fügten wir gleichzeitig mit dem Oxalat soviel Calciumchlorid hinzu, wie durch das Oxalat gefällt würde. Das Ergebnis geht aus der Kurve 2 in Abb. 1 hervor. Auch unter diesen Umständen, in denen kein Calciumentzug stattgefunden haben kann, wird die Glykogenolyse genau so prompt zum Verschwinden gebracht wie ohne Calciumzusatz. Damit ist eine eigene Giftwirkung des Oxalats ohne maßgebliche Beteiligung des Calciumentzuges anzunehmen.

Das gleiche Ergebnis hatten quantitative Versuche. Hier setzten wir wechselnde Mengen Oxalat hinzu, die nur einen bestimmten Teil des Calciums zu binden vermochten (Abb. 2. Kurve 1—3). Es zeigte sich,

daß selbst durch Zugabe einer sehr geringen Oxalatmenge, die nur 10% des vorhandenen Calciums äquivalent war, noch stets die Glykogenolyse zum Verschwinden gebracht werden konnte. Das ist eine Oxalatkonzentration von etwa 0,2 mMol/l. oder 1,8 mg %. Die Wirkung war weitgehend unabhängig davon, ob gleichzeitig mit dem Oxalat eine äquivalente Menge Calcium zugegeben wurde oder nicht. Selbst bei Bindung von nur 5% des vorhandenen Calciums war in den meisten Fällen noch ein Verschwinden der Glykogenolyse zu beobachten (Abb. 2, Kurve 3).

Um sicherzustellen, ob nicht auch schon durch Entzug so kleiner Calciummengen die Glykogenolyse gehemmt werden kann, haben wir die Glykogenolyse in Ringerlösung mit sinkendem Calciumgehalt untersucht. Wurde der Calciumgehalt um 10—30% reduziert, blieb die

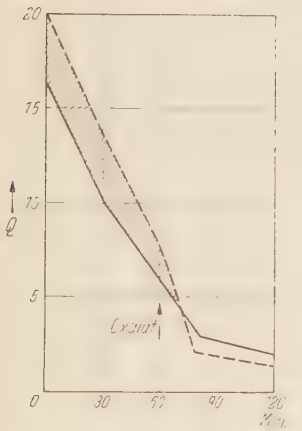


Abb. 3. Gewebsschnitte der normalen Rattenleber in calciumfreier Ringerlösung. Der Stoffwechsel sinkt katastrophal ab, die Glykogenolyse bleibt dagegen bestehen. Auf Oxalatzusatz verschwindet sie. (Erklärung wie Abb. 1.)

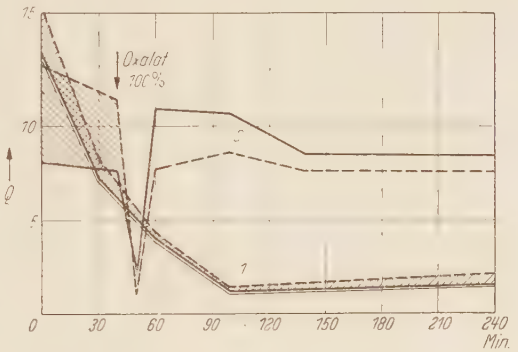


Abb. 4. In calciumfreier Ringerlösung fällt der Stoffwechsel der Leberschnitte steil ab (Kurve 1). In normaler Ringerlösung bleibt er dagegen auch nach Zusatz von Oxalat im Überschuß über das vorhandene Calcium auf der normalen Höhe (Kurve 2). (Erklärung wie Abb. 1.)

Glykogenolyse und der Stoffwechsel unbeeinflußt. Ein weiteres Senken des Calciumspiegels hatte für das Gewebe offenkundig schwere Folgen, das Stoffwechselniveau sank beträchtlich, ohne daß indessen die Glykogenolyse kleiner wurde. In calciumfreier Lösung sank der Stoffwechsel rapide bis nahe an den Nullpunkt (Abb. 3 und 4) unter Erhaltenbleiben der Glykogenolyse, ja, diese konnte auch jetzt noch durch Oxalat zum Verschwinden gebracht werden (Abb. 3). Diese Versuche zeigen damit schlüssig, daß die Giftwirkung des Oxalats auf die Glykogenolyse auch nicht einmal zum Teil durch seine calciumfällende Wirkung verursacht sein kann.

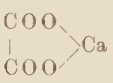
Ferner zeigen diese Ergebnisse, daß die Leber auf das Vorhandensein von Calcium in der physiologischen Konzentration angewiesen ist. Das ist um so bemerkenswerter, als andere Gewebe, z. B. die Speicheldrüse,

in calciumfreier Lösung nicht nur weiterleben, sondern sogar noch reaktionsfähig bleiben.

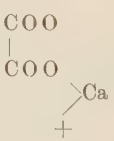
Daß die Wirkung des Oxalats auch hier keinesfalls mit dem Entzug von Calcium gleichzusetzen ist, zeigt ein Vergleich der Versuche in calciumfreier Ringerlösung mit Versuchen, in denen alles Calcium durch einen geringen Überschuß von Oxalat „entzogen" wurde (Abb. 4). Im ersten Falle sinkt der Stoffwechsel katastrophal ab, im zweiten verläuft dagegen die Atmung auf normaler Höhe weiter und es verschwindet nur die Glykogenolyse. Also muß das Calciumoxalat noch Wirkungen haben, die die Verhältnisse deutlich günstiger gestalten, als sie in calciumfreiem Milieu sind. Solche Annahmen wurden bereits in anderen Zusammenhängen geäußert [23].

Daß Calciumoxalate andererseits auch noch Oxalatwirkungen besitzen können, läßt sich ebenfalls nicht ohne weiteres ausschließen. Vielmehr scheinen uns unsere Befunde sogar auf solche Möglichkeiten hinzudeuten. — Die Bindung von Oxalat durch Calcium erfolgt als Ionenreaktion sehr schnell (im Gegensatz zur Ausfällung), besonders dann, wenn ein großer Überschuß an Calcium zur Verfügung steht, wie in unseren Versuchen mit kleinen Oxalatkonzentrationen. In diesen Fällen wäre eigentlich anzunehmen, daß das Oxalat bereits sofort nach dem Einbringen in die Ringerlösung mit dem Calcium reagierte. Trotzdem trat die Wirkung auf die Glykogenolyse stets ein, das Oxalat war also trotz des vorhandenen Calciumüberschusses wirksam geblieben. Wurde indessen gefälltes Calciumoxalat zugegeben, so blieb selbst bei Anwendung größerer Mengen die Glykogenolyse unbeeinflußt (Abb. 2, Kurve 4): gefälltes Calciumoxalat ist also unwirksam. Diese Sachverhalte lassen daran denken, daß unter verschiedenen Umständen gebildetes Calciumoxalat nicht unbedingt in allen Fällen von Anfang an identisch zu sein braucht. Da hier sowohl das Kation wie das Anion zweiwertig sind, müssen wenigstens während des Reaktionsablaufes neben der einfachen und wohl unwirksamen Form, die üblicherweise durch die Formel (I) wiedergegeben wird,

I



II



auch andere Formen für möglich gehalten werden, aus deren formelmäßigen Darstellung ohne weiteres sowohl gewisse Oxalat- als auch Calcium-

[23] Heubner, W., u. P. Rona: Biochem. Z. **93**, 217 (1919); F. Günther u. W. Heubner: Klin. Wschr. **3**, 789 (1924); G. Orzechowski: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **184**, 694 (1937).

wirkungen noch vorstellbar sind. Kompliziert werden diese Fragen noch durch die Neigung des Oxalats, mit verschiedenen Substanzen, die im Organismus eine wesentliche Rolle spielen und überall vorhanden sind, Komplexe zu bilden. Jedenfalls ist anzunehmen, daß die Reaktion, der das Oxalat bei seiner Wirkung im Organismus unterliegt, durch die Formel (I) nicht erschöpfend wiedergegeben ist, ebensowenig wie die einfache Vorstellung, daß das Calcium als Oxalat ausgefällt und damit verschwunden ist, ausreicht, um die anscheinend recht komplizierten Vorgänge zu verstehen.

Wenn in der Niere und im Harn Oxalatkristalle gefunden werden, so kann daraus auch nicht ohne weiteres geschlossen werden, daß das Calcium im Organismus genau so ausfällt. Vielmehr ist sicher bekannt[24], daß lösliche Oxalate vom Darm her trotz Vorhandenseins von Calcium gut resorbiert und ausgeschieden werden. Im Blute und Serum (Pferd) ist Oxalsäure bis zu 0,5% löslich (Müller), ja das Oxalat bildet in zwar wechselnden Mengen, doch aber einen regelmäßigen Bestandteil des Organismus, und zwar wurden im normalen Serum 1—7 mg% und unter pathologischen Umständen bis 60 mg% gefunden (Lit. bei Müller[24]). Von Interesse ist, daß die Leber besonders reich an Oxalat sein soll. Es wurden bis zu 43 mg% gefunden[25]. Indessen ist anzunehmen, daß die durchschnittlichen Werte wesentlich geringer sind. Aber selbst, wenn nur die im Serum vorhandenen Mengen Oxalat auch für die Leber angenommen werden, würde diese Oxalatmenge nach unseren Befunden bei weitem ausreichen, die Glykogenolyse zu beeinflussen, sofern das Oxalat hier in noch wirksamer Form vorliegt, was keineswegs abgelehnt werden kann. Das erscheint um so bedeutsamer, als wir das Oxalat an der Glykogenolyse der Leber weit wirksamer fanden, als an jedem anderen untersuchten Gewebe. Domini[25] fand das Oxalat auch auf die Atmung der Leber ebenfalls weit wirksamer als auf die Atmung anderer Organe. Er führt das darauf zurück, daß Galle den Eintritt des Oxalats in die Zelle begünstigt. Tatsächlich verhindert Galle nicht nur das Ausfallen von Calciumoxalat, sondern vermag gefälltes Oxalat sogar wieder in Lösung zu bringen (Müller[24]). Nach diesen Ergebnissen muß es für möglich gehalten werden, daß der physiologisch vorkommende Oxalatgehalt in der Leber ausreicht, in vivo Wirkungen auf die Glykogenolyse auszuüben, die um so mehr sogar regulatorische Bedeutung haben können, als die Oxalsäure im normalen Stoffwechsel gebildet werden kann. Damit soll nur angedeutet sein, wie wenig die Auffassung der Oxalatwirkung als „Calciumentzug" als erschöpfende Darstellung gelten kann.

[24] Flaschenträger, B., u. P. B. Müller: Hoppe-Seylers Z. **251** (1937); P. B. Müller: Ebenda **256**, 75 (1938); P. B. Müller: Dissertation, Zürich 1937; G. Orzechowski, P. Gömöri u. M. Hundrieser: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **178**, 739 (1935). — [25] Domini, G.: Arch. di Fisiol. **38**, 445, 474 (1939).

Mit diesen Ausführungen soll keineswegs gesagt sein, daß die Bindung von Calcium bei der Giftwirkung des Oxalats keine wesentliche Rolle spielte, sondern lediglich, daß es nicht die allein wesentliche Wirkung ist. Der „Calciumentzug" wird an jenen Organen besondere Ausfallserscheinungen hervorrufen müssen, die auf das Vorhandensein von Calciumionen angewiesen sind. Das gilt zwar für die Leber, aber wir sahen, daß die Atmung der Leber bei Zusatz einer dem vorhandenen Calcium äquivalenten Menge Oxalat auf der normalen Höhe bleibt, während sie in calciumfreier Lösung katastrophal sinkt.

Es scheint uns der Beachtung wert, daß in kaliumfreier Lösung der gleiche Effekt zu beobachten ist[26]. Die Atmungskurve der Leber hat in kaliumfreier Lösung genau denselben Verlauf wie in calciumfreier Ringerlösung. Da also einerseits die Leber auf das Vorhandensein von Kalium angewiesen ist[26] (wenigstens solange eine Glykogenolyse besteht) und zum anderen die Auswanderung von Kalium aus dem Gewebe durch das „abdichtend" wirkende Calcium verhindert oder wenigstens gehemmt wird („kaliumsparende" Funktion des Calciums), muß bei Abwesenheit von Calcium ein stärkerer Kaliumverlust stattfinden. Damit wäre verständlich, daß ein „Calciumentzug" ähnliche Wirkungen haben kann wie ein Kaliumentzug. In diesem Zusammenhang gewinnt die eingangs erwähnte Beobachtung von Luithlen[12] und von Stransky[12] an Interesse, die bei oxalatvergifteten Tieren feststellten, daß die „Demineralisierung" nicht allein auf Kosten des Calciums geht, sondern mit einem noch weit stärkeren Kaliumverlust verbunden ist.

Die Wirkung des Oxalats auf die Glykogenolyse der Leber ist, wie oben gezeigt wurde, unabhängig vom Calciumgehalt und kann sicher nicht durch Calciumentzug verursacht sein. Dafür spricht auch die Tatsache, daß Calcium selbst die „Lactacidogen"-Synthese ebenso begünstigt[27] wie Oxalat, der Calciumentzug damit gerade der Oxalatwirkung auf die Glykogenolyse entgegenwirken müßte, sie also keinesfalls bedingen kann. Oxalat wirkt hier nicht durch die Fällung des Calciums giftig, vielmehr ist anzunehmen, daß das an sich giftige Oxalat durch Fällung mit Calcium gerade entgiftet wird, denn gefälltes Calciumoxalat ist auf die Glykogenolyse nicht mehr wirksam (Abb. 2, Kurve 4). Wird durch zu hohe Oxalatdosen dabei mehr Calcium verbraucht, als einzelne Organe entbehren können, so werden sich in diesen durch Calciumentzug bedingte Ausfallserscheinungen ergeben, daneben können indessen gleichzeitig direkte Oxalatwirkungen auftreten. Unsere Versuche an Lebergewebe haben gezeigt, daß es Organe gibt, die selbst durch geringe Oxalatdosen entscheidend beeinflußt werden, und zwar ohne Mitwirkung des „Calciumentzugs".

[26]) Brock, N., H. Druckrey u. H. Herken: Biochem. Z. **302**, 393 (1939). — [27] Embden, G.: Handb. d. norm. u. path. Phys. **8**, 417 (1925).

Zusammenfassung.

1. Die Glykogenolyse von Gewebsschnitten der Rattenleber wird durch Oxalat vergiftet. Die völlige Aufhebung der Glykogenolyse gelingt sicher noch mit Oxalatmengen, die nur 10% des vorhandenen Calciums äquivalent sind, und zwar auch dann, wenn gleichzeitig eine entsprechende Menge Calcium zugefügt wird. Eine Herabsetzung des Calciumgehalts in der Ringerlösung bis auf 30% hat dagegen keine Wirkung auf den manometrisch meßbaren Stoffwechsel. Auch bei völligem Fehlen des Calciums bleibt die Glykogenolyse erhalten.

2. In calciumfreier Ringerlösung sinkt der Gasstoffwechsel katastrophal bis an den Nullwert ab. Wird dagegen bei Untersuchung in calciumhaltiger Ringerlösung soviel Oxalat zugegeben, wie zur Bindung des gesamten vorhandenen Calciums nötig ist, so bleibt die Atmung trotzdem auf der normalen Höhe. Die Bindung des Calciums durch Oxalat kann also — wenigstens in dieser Hinsicht — nicht dem Entzug von Calcium gleichgesetzt werden.

3. Gefälltes Calciumoxalat ist ohne Wirkung auf die Glykogenolyse.

4. Nach diesen Ergebnissen wirkt das Oxalat auf die Glykogenolyse unmittelbar, und nicht durch Fällung des Calciums giftig; es wird vielmehr durch diese Ausfällung gerade „entgiftet".

5. Da Oxalat in der Leber in einer auf die Glykogenolyse wirksamen Konzentration physiologisch vorhanden ist, ist eine physiologische Funktion der Oxalsäure wahrscheinlich.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Über den Einfluß der akuten Sublimatvergiftung auf den Hormongehalt des Hypophysenhinterlappens*.

Von

L. Frühfahrt.

(Eingegangen am 31. Oktober 1939.)

Nach den Ergebnissen von Kuschinsky[1], der bei der Ratte nach Novasurolzufuhr Veränderungen des Gehalts an diuresehemmender Substanz des Hinterlappens gefunden hatte, sollte die Frage untersucht werden, ob auch die akute Sublimatvergiftung bei der Ratte irgendwelche Änderungen des Hypophysenhinterlappen-(HHL.)-Hormongehalts erkennen lassen würde.

Pak[2] hatte bereits bei der subakut-chronischen Sublimatvergiftung der Ratte eine Verminderung des uteruswirksamen Prinzips beobachtet, allerdings nur bei Tieren, die während der wochenlangen Behandlung stark an Gewicht abgenommen hatten. Hesse[3] hatte an Kaninchen in akuten Versuchen gleichfalls eine Verminderung an uteruswirksamer und auch an blutdruckwirksamer Substanz gefunden.

In den folgenden Untersuchungen wurde zunächst bei einer Reihe von Ratten die eben ertragene Dosis Sublimat festgestellt. Dann wurde der Gehalt an diuresehemmender und in einigen Fällen auch an uteruswirksamer Substanz nach Injektion dieser subletalen Dosis geprüft. Die Gehaltsbestimmung wurde 24 und 96 Stunden nach der Zufuhr des Sublimats vorgenommen.

Feststellung der bis zum vierten Tage subletalen Dosis Sublimat für die Ratte.

20 Tiere im Gewicht von 150–200 g erhielten eine 0,2%ige Sublimatlösung subcutan. 3 von 4 Tieren starben nach 7,5 mg pro kg am 3. oder 4. Tage. 6 mg pro kg wurden von 10 Tieren vertragen, ebenso 4,5 mg pro kg von 6 Tieren. Die Sektion ergab bei den gestorbenen Tieren das Bild der Nephrose. Andere 15 Versuchstiere mit höherem Gewicht (200–250 g) zeigten eine höhere Resistenz, denn sie vertrugen 8 mg pro kg 4 Tage lang, zeigten dann allerdings deutliche Vergiftungserscheinungen (Übererregbarkeit, Tremor). Bei 8 Ratten wurde nach 8 mg pro kg Sublimat für die

* D. 11.

[1] Kuschinsky, G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 536 (1939). — [2] Pak, C.: Ebenda **114**, 354 (1926). — [3] Hesse, E.: Ebenda **107**, 43 (1925).

Dauer von 96 Stunden die Harnproduktion geprüft. Die Tiere wurden während dieser Zeit einzeln in Diuresekäfigen gehalten und erhielten Wasser ad libitum (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Harnsekretion nach 8 mg pro kg Sublimat subcutan.

	Ratte I 240 g	Ratte II 170 g	Ratte III 165 g	Ratte IV 235 g	Ratte V 230 g	Ratte VI 245 g	Ratte VII 225 g	Ratte VIII 250 g
Nach 24 Std.	6 ccm	0 ccm	2,3 ccm	7 ccm	5,5 ccm	17 ccm	4 ccm	11 ccm
„ 48 „	0 „	0 „	0,5 „	2 „	0 „	1,5 „	2 „	18 „
„ 72 „	0 „	0 „	0 „	0 „	0 „	0,3 „	4,3 „	39 „
		Exitus	Exitus					
„ 96 „	0 „			0 „	0 „	0 „	3,8 „	19 „

In fast allen Fällen versiegte die Harnsekretion am 3. Tage völlig, nur 2 Ratten lieferten am 4. Tage noch Harn, sogar eine ganz beträchtliche Menge.

Methodik der Auswertung des Hormongehalts.

Als Hypophysenspender dienten männliche Ratten im Gewicht von 150—250 g. Die Tiere im Gewicht von 150—200 g erhielten je 6 mg pro kg Sublimat subcutan, die im Gewicht von 200—250 g je 8 mg pro kg. Es wurde eine 0.2%ige Sublimatlösung gegeben. Die unbehandelten Kontrolltiere hatten jedesmal ungefähr das gleiche Körpergewicht wie die Versuchstiere. Eine Gruppe von Tieren wurde 1 Tag, eine zweite Gruppe 4 Tage nach der Sublimatzufuhr durch Nackenschlag getötet. Der Hinterlappen wurde sofort herausgenommen und auf einer empfindlichen Torsionswaage gewogen. Das Gewicht lag zwischen 0,8 und 1,5 mg. Sofort nach der Wägung wurden die Hinterlappen mit einem Tropfen 0.25%iger Essigsäure verrieben und der Extrakt auf 3 ccm derselben Essigsäure verdünnt. Darauf folgte 3 Minuten langes Kochen bei 100° C, luftdichter Verschluß des Reagensglases mit sterilem Gummistopfen und ein- bis zweitägiges Aufbewahren im Kühlschrank bei etwa + 3° C. Eine gewisse Fehlerquelle mag in der Abtrennung des Hinterlappens vom Vorderlappen zu suchen sein. Allerdings läßt sie sich durch zahlreiche Übungen und Beibehalten desselben Präparierenden für alle Versuche reduzieren.

Bei den Diureseversuchen wurden die Vorschriften von Burn[4] innegehalten. 48 Tiere wurden zu Gruppen von je 4 zusammengestellt. Jedes Tier erhielt mittels Schlundsonde $^1/_{20}$ seines Körpergewichts Wasser per os und 5 γ des auszuwertenden Hypophysenextraktes subcutan. Bei den meisten Versuchen wurde 6 Gruppen Ratten Hypophysenhinterlappenextrakt normaler Ratten, 6 anderen Gruppen Hypophysenhinterlappenextrakt sublimatvergifteter Tiere injiziert. In einigen Fällen wurden außer

[4] Burn, J. H.: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin, Jul. Springer, 1937.

dem an je 2 Gruppen 4 Millieinheiten des als Standard benutzten Hypophysins des Handels injiziert, während zwei andere Gruppen nur Wasser erhielten. Jede der aufgezählten Gruppen wurde in einen Diuresekäfig gesetzt, und die Harnportionen wurden von Beginn der Ausscheidung an bis zur dreimaligen Konstanz, also praktisch bis zur völligen Ausscheidung des eingespritzten Wassers, viertelstündlich am Standglas abgelesen. Die Zeit bis zum Eintritt der maximalen Ausscheidung einer Gruppe wurde errechnet und die Durchschnittswerte von je 6 Gruppen wurden in die Tabellen 2 und 3 eingetragen.

Tabelle 2. Hypophysenhinterlappen-Gewichte und antidiuretische Wirksamkeit von 5 γ Hypophysenhinterlappen-Substanz, 24 Stunden nach subcutaner Injektion von Sublimat, gemessen an der Zeit der maximalen Harnausscheidung (Z. d. m. A.) von Gruppen zu je 4 Ratten.

A. Sublimatdosis: 6 mg pro kg.

Datum	HHL.-Gewicht normaler Spender mg	Empfänger Ratten (Burn-Versuch), antidiuretischer Effekt von 5 γ HHL., gemessen an der Z. d. m. A. in Min.	HHL.-Gewicht 24 Std. nach subcut. Injektion von 6 mg/kg Sublimat mg	Empfänger Ratten (Burn-Versuch), antidiuretischer Effekt von 5 γ HHL., gemessen an der Z. d. m. A. in Min.
24. IX. 1938	1,22	119 (4 Gr.)*	1,02	130 (4 Gr.)*
6. X. 1938	0,91	128 (6 Gr.)	0,94	110 (5 Gr.)
15. X. 1938	0,85	119 (6 Gr.)	0,96	130 (6 Gr.)
Gesamtdurchschnittswerte (Zahl der Tiere)		122 (64)		123 (60)
Mittlerer Fehler		± 3,15		± 6,21

* In Klammern die Anzahl der Gruppen, deren Durchschnittswert genommen wurde.

B. Sublimatdosis: 8 mg pro kg.

Datum	HHL.-Gewicht normaler Spender mg	Empfänger Ratten (Burn-Versuch), antidiuretischer Effekt von 5 γ HHL., gemessen an der Z. d. m. A. in Min.	HHL.-Gewicht 24 Std. nach subcut. Injektion von 8 mg/kg Sublimat mg	Empfänger Ratten (Burn-Versuch), antidiuretischer Effekt von 5 γ HHL., gemessen an der Z. d. m. A. in Min.
22. II. 1939	1,40	128 (6 Gr.)*	1,10	124 (6 Gr.)*
24. II. 1939	0,95	131 (4 Gr.)	1,45	125 (6 Gr.)
3. III. 1939	1,12	119 (6 Gr,)	0,81	128 (5 Gr.)
7. III. 1939	1,30	135 (6 Gr.)	1,10	131 (5 Gr.)
14. III. 1939	0,82	120 (5 Gr.)	0,98	126 (4 Gr.)
Gesamtdurchschnittswerte (Zahl der Tiere)		127 (108)		127 (104)
Mittlerer Fehler		± 3,11		± 1,24

* In Klammern die Anzahl der Gruppen, deren Durchschnittswert genommen wurde.

Die Ergebnisse, die aus der Tabelle 2 ersichtlich sind, ergeben keine signifikante Differenz zwischen dem Hormongehalt der behandelten und

Tabelle 3. Hypophysenhinterlappen-Gewichte und antidiuretische Wirksamkeit von 5 γ Hypophysenhinterlappen-Substanz, 96 Stunden nach subcutaner Injektion von Sublimat, gemessen an der Zeit der maximalen Harnausscheidung (Z. d. m. A.) von Gruppen zu je 4 Ratten.

A. Sublimatdosis: 6 mg pro kg.

Datum	HHL.-Gewicht normaler Spender mg	Empfänger Ratten (Burn-Versuch), antidiuretischer Effekt von 5 γ HHL., gemessen an der Z. d. m. A. in Min.	HHL.-Gewicht 96 Std nach subcut. Injektion von 6 mg/kg Sublimat mg	Empfänger Ratten (Burn-Versuch), antidiuretischer Effekt von 5 γ HHL., gemessen an der Z. d. m. A. in Min.
27. VIII. 1938	1,41	137 (6 Gr.)*	1,12	153 (5 Gr.)*
27. IX. 1938	1,25	119 (4 Gr.)	1,00	123 (4 Gr.)
1. X. 1938	0,91	116 (4 Gr.)	1,21	119 (3 Gr.)
11. X. 1938	1,10	132 (6 Gr.)	0,83	140 (6 Gr.)
20. X. 1938	0,82	112 (5 Gr.)	0,88	105 (6 Gr.)
19. XI. 1938	0,80	127 (6 Gr.)	1,14	127 (6 Gr.)
11. I. 1939	1,48	130 (5 Gr.)	0,92	126 (5 Gr.)
20. I. 19 9	0,92	144 (6 Gr.)	0,95	124 (6 Gr.)
26. I. 1939	0,90	127 (6 Gr.)	0.87	134 (6 Gr.)
Gesamtdurchschnittswerte (Zahl der Tiere)		127 (192)		128 (188)
Mittlerer Fehler.....		± 3,69		± 4,82

* In Klammern die Anzahl der Gruppen, deren Durchschnittswert genommen wurde.

B. Sublimatdosis: 8 mg pro kg.

Datum	HHL.-Gewicht normaler Spender mg	Empfänger Ratten (Burn-Versuch), antidiuretischer Effekt von 5 γ HHL., gemessen an der Z. d. m. A. in Min.	HHL.-Gewicht 96 Std. nach subcut. Injektion von 8 mg/kg Sublimat mg	Empfänger Ratten (Burn-Versuch), antidiuretischer Effekt von 5 γ HHL., gemessen an der Z. d. m. A. in Min.
7. II. 1939	1,14	126 (5 Gr.)*	1,01	139 (5 Gr.)*
15. II. 1939	0,85	116 (6 Gr.)	1.16	134 (5 Gr.)
18. II. 1939	0,96	116 (6 Gr.)	0,97	131 (6 Gr.)
28. II. 1939	0,90	127 (6 Gr.)	0,82	134 (5 Gr.)
27. III. 1939	0,79	107 (5 Gr.)	0.87	120 (5 Gr.)
Gesamtdurchschnittswerte (Zahl der Tiere)		118 (192)		132 (184)
Mittlerer Fehler		± 3,7		± 3,19

* In Klammern die Anzahl der Gruppen, deren Durchschnittswert genommen wurde.

der unbehandelten Tiere. Auch Tabelle 3A läßt keinen Einfluß der Sublimatvergiftung auf den Hormongehalt des HHL. erkennen. Dagegen zeigt Tabelle 3 B eine Erhöhung des Gehalts des HHL. 96 Stunden nach subcutaner Injektion von 8 mg/kg Sublimat. Bei der Berechnung der signifikanten Differenz unter Zuhilfenahme der Tabelle von R. A. Fischer[5]

[5] Siehe Burn, J. H.: a. a. O., S. 22 u. 215.

ergibt sich, daß der beobachtete Unterschied nicht mehr als einmal in 100 Versuchen durch Zufall bedingt ist. Wir können also die Differenz als signifikant bezeichnen.

Versuche am isolierten Uterus.

In 5 Versuchen wurde der Hormongehalt der beschriebenen HHL.-Extrakte an isolierten Ratten- und Schafuteri bestimmt. Die Ergebnisse waren hier so wechselnd und die Zahl der Versuche so gering, daß sich keine endgültigen Schlüsse daraus ziehen lassen.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Versuche haben uns zunächst wieder gezeigt, wie verschieden die vertragenen Sublimatdosen unter verschiedenen Versuchsbedingungen sein können. Unsere Ratten haben weit weniger Sublimat vertragen als die Ratten von C. Pak. Außerdem ließ sich auch bei uns eine Abhängigkeit der Giftempfindlichkeit vom Alter bzw. vom Körpergewicht der Tiere beobachten.

Die Ergebnisse der HHL.-Hormonauswertungen bei normalen und sublimatvergifteten Ratten stehen im Gegensatz zu den Versuchen von Hesse und Pak, die eine Senkung des Hormongehalts nach Sublimat feststellten. Allerdings hat Hesse andere Versuchstiere benutzt und Pak subakute chronische Versuche an Ratten durchgeführt. Auch haben beide Autoren nicht die Diuresehemmung als Maß der Wirksamkeit verwendet. Immerhin hätten unsere Uterusversuche bei Wirkungen im Sinne von Hesse und Pak zu eindeutigen Ergebnissen führen müssen. Die Befunde lassen daran denken, daß für den Fall einer Parallelität zwischen Hormongehalt und Sekretion des HHL. eine Beziehung zur Harnsperre nach Sublimat vorhanden sein könnte, zumal die eingangs erwähnten Novasuralversuche eine Verminderung des Hormongehalts 24 Stunden nach der Injektion ergeben haben. Diurese und Harnsperre haben also ihre Parallele im Hormongehalt des HHL. und vielleicht auch in der Hormonsekretion.

Zusammenfassung.

1. Es werden bei der Ratte subletale Dosen für Sublimat festgestellt.

2. Der Gehalt von Hypophysenhinterlappen meiner Ratten an harnhemmender Substanz war 24 Stunden nach subcutaner Injektion von 6 und 8 mg/kg Sublimat und 96 Stunden nach 6 mg/kg nicht verändert.

3. 96 Stunden nach subcutaner Injektion von 8 mg/kg Sublimat war der Gehalt der Rattenhinterlappen an harnhemmender Substanz vermehrt.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. Janssen) und dem Pharmakologischen Laboratorium der Firma Hoffmann-La Roche, Basel.

Die Entgiftung des Digitoxins bei der weißen Ratte*.

Von

Kurt Nikolai von Kaulla.

(Eingegangen am 13. November 1939.)

Das Studium der Digitoxinvergiftung im Tierversuch hat grundsätzlich wichtige Einsichten über pharmakologische Wirkungen vermittelt. Das beruht wesentlich darauf, daß das Digitoxin, wahrscheinlich wohl in besonders charakteristischer Weise, infolge seiner besonderen Haftfestigkeit an Gewebskolloiden, Kumulierungserscheinungen zeigt. Lange Zeit war man der Annahme, daß eine verstärkte Wirkung durch die zweite und folgenden Dosen als eine Summation dieser Mengen mit den Resten früherer Dosen aufzufassen sei. Auf Grund dieser Auffassung hat Hatcher (1) für die Katze, an der die Kumulierungserscheinungen besonders stark sind, gefolgert, daß eine einzige, nicht tödliche Dosis des Glykosides etwa 3 Wochen brauche, um wieder ganz aus dem Herzen zu verschwinden. Diese Schlußfolgerung, die allgemein angenommen war, wurde erst nach langen Jahren durch Fromherz und Bauer (2) als unrichtig erkannt. Immerhin zeigen alle Tiere, an denen die Digitoxinwirkung geprüft wurde - speziell das Kaninchen und der Hund, aber auch die Katze trotz ihrer besonderen Neigung zur Kumulierung — deutlich Entgiftungsvorgänge. Die Größe dieser Entgiftung kann man entweder durch Dauerinfusion mit verschiedenen Geschwindigkeiten oder durch einmaliges Injizieren einer subcutanen Dosis und späteres Auffüllen mit Strophanthin feststellen. Auffallend wäre, wenn allein die Ratte hierbei eine Sonderstellung einnehmen würde.

Nach den Angaben von Heubner und Nyary soll die Dosis letalis für Digitoxin für die weiße Ratte bei intravenöser Injektion 12 mg/kg betragen. Diese Letaldose ergab sich sowohl bei kurzdauernder Infusion innerhalb von 12 Minuten als auch bei sehr langsamer Infusion mit dem Eintritt des Todes nach 3 Stunden (3). Die Entgiftungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Tieren nach dem bisherigen Schrifttum zeigt die folgende Tabelle (s. S. 180) in Beziehung zur Dosis letalis.

Hieraus scheint sich zu ergeben, daß die Ratte trotz relativ hoher Resistenz gegen Digitoxin keinerlei Entgiftungsvorgänge zeigt. Dies ist um so erstaunlicher, als von Straub festgestellt wurde, daß das Serum der Ratte Digitalisglykoside schnell zerstört (4). Ein im Serum von Ratten vorhandenes Enzym, dem diese besondere Fähigkeit zur Glykosidspaltung

Tabelle 1. Letaldosen und Entgiftungsgeschwindigkeit des Digitoxins.

Tierart	Dosis letalis in mg/kg	Eliminierung pro Stunde	
		mg/kg	% d. Dosis let.
Katze	0,18	0,002	1,1
Kaninchen	0,56	0,120	22,0
Ratte	12,00	—	—

zukommt, konnte angereichert werden (5). Auch Versuche, die mit einer Durchströmungseinrichtung unternommen wurden, die es gestattet, isolierte Ratten- und Meerschweinchenherzen am geschlossenen Koronarkreislauf mit der zu prüfenden Glykosidlösung zu durchströmen, haben dargetan, daß die hohe Resistenz des Rattenherzens nicht allein auf besonderen Bindungs- und Verteilungsbedingungen im Organismus beruhen kann (6). So erschien es wünschenswert, die Frage der hohen Digitoxinresistenz der weißen Ratte sowie ihre Entgiftungsfähigkeit nochmals einer genaueren Prüfung zu unterziehen.

Methodisches.

Es muß von vornherein betont werden, daß das Arbeiten mit Digitoxin wegen seiner außerordentlich schlechten Löslichkeit in indifferenten Lösungsmitteln sehr schwierig ist. Auch seine Löslichkeit in Alkohol ist gering, sowie es in hohem Reinheitsgrad kristallisiert vorliegt, während weniger reine Digitoxinpräparate sich in Alkohol relativ leicht lösen. Heubner und Nyary haben bei ihren Versuchen eine 1‰ige Digitoxinlösung in 40%igem Alkohol verwandt. Dabei waren sie bei längerer Infusionsdauer genötigt, Alkoholmengen zu infundieren, die nur 30% unter der durchschnittlichen letalen Dose des Alkohols für die Ratte lagen (3). Außerdem scheint es, daß diese Autoren damals noch kein völlig reines Digitoxin in den Händen hatten. Denn bei den nun zu beschreibenden Versuchen kristallisierte das Digitoxin bei der oben angegebenen Konzentration außerordentlich leicht aus, und so war diese Lösung für Infusionsversuche von längerer Dauer schlecht brauchbar. Wir haben für alle Versuche das Digitoxin der Firma Hoffmann-La Roche in Basel verwandt. Wir konnten uns an Hand der von dieser Firma freundlicherweise überlassenen Fraktionen verschiedenen Reinheitsgrades immer wieder überzeugen, daß die Löslichkeit des kristallisierten Digitoxins umgekehrt proportional dem Reinheitsgrade ist. Hieraus ergab sich im Laufe unserer Versuche die zwingende Notwendigkeit, geeignetere Lösungsmittel geringerer Toxizität zu finden.

So wurde nach zahlreichen Vorversuchen im Methylpiperidon in Kombination mit Alkohol ein Lösungsmittel gefunden, das gestattet, ohne Schwierigkeiten 2‰ige Digitoxinlösungen herzustellen. Über die Einzelheiten dieses Vorgehens wird weiter unten die Rede sein.

I. Subcutane Injektion.

Es wurde nun zunächst die Dosis letalis minima für Digitoxin bei der weißen Ratte bei subcutaner Injektion festgestellt. Bei Katze und Meerschweinchen betrug das Verhältnis der Dosis letalis bei intravenöser und subcutaner Injektion ungefähr 1 : 3. Nach einigen Vorversuchen, die hier nicht aufgeführt werden sollen, zeigte sich bald, daß subcutan sehr hohe Dosen injiziert werden mußten, um überhaupt Vergiftungserscheinungen

hervorzurufen. Zur Feststellung der geringsten tödlichen Dosis wurden die Tiere prinzipiell 3 Wochen lang beobachtet, da wir sicher wissen, daß wenigstens bei der Katze nach Digitoxinvergiftung Spättodesfälle vorkommen, die zwar nicht, wie man früher annahm, auf Speicherung des Giftes im Herzen, sondern auf den durch den einmaligen Digitoxinstoß gesetzten Schädigungen beruhen (7). Die Tiere wurden dann seziert und seltene Fälle von interkurrenten Krankheiten — es handelte sich meist um vereiternde Pneumonien — ausgeschieden.

Tabelle 2.
Subcutane Injektion von Digitoxin, 1 : 50 in 70%igem Alkohol.

Dose in mg/kg	Zahl der Tiere		Bemerkungen
	überlebende	tote	
50	2	0	—
80	6	0	—
100	4	2	Tod nach 1 bzw. 4 Tagen
150	0	2	„ „ 5 „ 12 „

Aus Tabelle 2 ergibt sich eindeutig eine auffallend hohe Verträglichkeit des Digitoxins bei subcutaner Injektion. Die Dosis letalis scheint etwa bei 120 mg/kg zu liegen. Sicher spielt hier die individuelle Empfindlichkeit eine gewisse Rolle. Auffallend ist auch die relativ lange Lebensdauer der Tiere mit 150 mg/kg. Durch die hohe Alkoholkonzentration (70%) bedingte Gewebsschädigungen mußten sich in diesen Vorversuchen für die gestellte Frage in erster Linie als Resorptionshemmung geltend machen. Versuche mit noch höheren Digitoxindosen konnten nicht unternommen werden, da, wie Kontrollen zeigten, die hierbei benötigte Alkoholmenge allein den Tod herbeiführt. Schon aus diesen Ergebnissen ist man geneigt zu schließen, daß die Ratte eine relativ hohe Entgiftungsfähigkeit besitzt, denn der Verlauf der Versuche zeigte, daß sie die langsam aus dem gesetzten Digitoxindepot in den Kreislauf dringenden Digitoxinmengen zu entgiften imstande ist. Zur Prüfung dieser Auffassung diente eine neue Serie, bei der die Resorptionsfläche künstlich vergrößert wurde durch Verteilung der zu injizierenden Digitoxinmengen auf mehrere Einstichstellen.

Tabelle 3. Auf mehrere Einstichstellen verteilte subcutane Injektionen von Digitoxin, 1 : 50 in 70%igem Alkohol.

Dose in mg/kg	Einstichstellen	Tod nach Tagen	Dose in mg/kg	Einstichstellen	Tod nach Tagen
100	5	1	18	5	9
100	5	4	18	5	10
100	5	4	18	5	überlebt
100	5	3	12	5	„
28	4	1	12	5	„
32	4	1	12	5	„

Es ergeben sich also hier bereits Widersprüche zu den aus den Versuchen von Heubner und Nyary zu ziehenden Folgerungen, denn die mit einer einzigen Injektionsstelle ermittelte Dosis letalis beträgt 100 mg und mehr pro kg. Die verzögerte Resorption aus dem Unterhautzellgewebe hat also eine beträchtliche Entgiftung ermöglicht, die nach den Versuchen von Heubner und Nyary nicht zu erwarten war. Die Abhängigkeit dieser Entgiftung von der Resorptionsgeschwindigkeit wird dadurch charakterisiert, daß die Injektion der einmaligen Dose auf 4 bis 5 Hautstellen verteilt von 18 mg/kg an tödlich war. Die unter diesen Bedingungen wesentlich raschere Resorption ließ eine stärkere Entgiftung nicht Platz greifen. Vollständigkeitshalber sei angefügt, daß wir bei einer Anzahl Tiere — besonders bei denen, die mit hohen Digitoxingaben behandelt wurden — an den Injektionsstellen Abszesse und Nekrosen sahen, die aber alle komplikationslos abheilten. Die gewebsreizende Wirkung des Digitoxins ist ja lange bekannt (8).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Resorptionsbedingungen für eine bestimmte Menge Digitoxin in ähnlicher Weise durch verteilte Injektionen verbessert; nur wurden die einzelnen Dosen nicht gleichzeitig, sondern in in bestimmten zeitlichen Abständen aufeinander folgenden subcutanen Einspritzungen verabfolgt. Auch bei dieser Versuchsanordnung zeigt sich eine höhere Toxizität des Digitoxins als bei einmaliger Injektion (Tabelle 4).

Tabelle 4. In zeitlichen Abständen verteilte Injektionen 1 : 50 in 70%igem Alkohol.

mg/kg	Gespritzt	Tod nach Std.	Gesamtdosis mg/kg	mg/kg	Gespritzt	Tod nach Std.	Gesamtdosis mg/kg
6 · 10	alle 2 Std.	48	60	7 · 10	alle 2 Std.	24	70
6 · 10	„ 2 „	24	60	7 · 10	„ 2 „	24	70
6 · 10	„ 2 „	24	60	7 · 10	„ 4 „	52	70
6 · 10	„ 2 „	14	60	7 · 10	„ 4 „	48	70
7 · 10	„ 2 „	16	70	7 · 10	„ 4 „	72	70
7 · 10	„ 2 „	18	70	7 · 10	„ 4 „	28	70

II. Intravenöse Injektion.

In nächster Linie wurde die letale Dose des Digitoxins im Gegensatz zu dem Vorgehen von Heubner und Nyary, die bis zum Herztod infundierten, bei einmaliger intravenöser Injektion und zeitloser Beobachtung bestimmt. Dabei erfolgte die intravenöse Injektion in der üblichen Weise in die Schwanzvene ohne Narkose, während einer Minute.

Zur Lösung des Digitoxins wurde ein Gemisch von Alkohol, Methylpiperidon und Wasser verwendet in einem Verhältnis, das gestattet, selbst auskristallisiertes Digitoxin durch leichtes Erwärmen wieder in Lösung zu

bringen, was bei Mischungen von Alkohol und Wasser nicht möglich ist. Es bewährte sich folgende Lösung:

10 mg Digitoxin in

1 ccm Alkohol = 20%,
1 „ Methylpiperidon = 20%,
3 „ Wasser = 60%.

Das Digitoxin bleibt in dieser Mischung bei ruhigem Stehen etwa 30 Minuten in Lösung, wenn man es unter Erwärmen erst in Alkohol löst, dann auf 40° erkalten läßt und dann gleich mit warmen (40°) Verdünnungsmitteln verdünnt. Es handelt sich also um eine 2‰ige Digitoxinlösung in 20%igem Alkohol mit 20% Methylpiperidon. Zur Feststellung der letalen Dosis des Methylpiperidons wurden einige orientierende Versuche ausgeführt. Das Methylpiperidon wurde mit 50%igem Alkohol so verdünnt, daß jeweils 2 ccm Alkohol pro kg Ratte gegeben wurden.

2 ccm Methylpiperidon intravenös pro kg Ratte wirken letal.
1 „ „ „ „ „ „ werden gut vertragen.
3 „ „ subcutan „ „ „ wirken letal.
2 „ „ „ „ „ „ werden gut vertragen.

Die Ergebnisse bei einmaliger intravenöser Injektion sind sehr bemerkenswert.

Tabelle 5. Intravenöse Injektion einer 2‰igen Digitoxinlösung während einer Minute.

mg/kg	Tod nach Tagen	Methylpiperidon in ccm/kg	mg/kg	Tod nach Tagen	Methylpiperidon in ccm/kg
5	1	0,5	3	1	0,3
5	1	0,5	2,5	1	0,25
5	1	0,5	2,5	2	0,25
5	1	0,5	2,5	überlebt in Beobachtungszeit	0,25
3,5	1	0,35			
3,14	1	0,314	2	„	0,2
3,1	1	0,31	2	„	0,2
3	überlebt in Beobachtungszeit	0,3			

Aus diesen Befunden geht hervor, daß die Dosis letalis für Digitoxin bei der weißen Ratte bei intravenöser Injektion und zeitloser Beobachtung bei 3 mg/kg liegt, wobei individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegen das Glykosid innerhalb geringer Grenzen bleiben. Es ist immerhin auffallend, wieviel niederer diese letale Dose ist, als die von anderen Autoren bei anderer Injektions- und Beobachtungsweise gefundene. Ein Einfluß des Methylpiperidons kann außer Betracht gelassen werden, da seine im Höchstfall injizierte Menge mit Sicherheit weniger als die Hälfte der letalen Dose betrug.

III. Langsame intravenöse Infusion bis zum Herztod.

Unter diesen Gesichtspunkten erschien es wünschenswert, die Infusionsversuche anderer Autoren einer nochmaligen Prüfung zu unterziehen. Es wurde hierzu die von W. Straub (9) beschriebene Spritze verwendet.

Zur Verwendung kamen ausschließlich ausgewachsene männliche gesunde Ratten. Die Tiere erhielten eine leichte Urethannarkose, die unmittelbar vor dem Eingriff durch eine Äthernarkose ergänzt wurde. Die Vena jugularis wurde freipräpariert und in dieselbe eine durch einen Schlauch mit der Motorspritze verbundene Glaskanüle eingeführt. Dabei wurde peinlich darauf gesehen, daß das System frei von Luftblasen blieb. Wenn gegen Ende des Versuchs die spontane Atmung schlecht wurde, wurde der Thorax geöffnet und nach einer von W. R. Hess angegebenen Methode bis zum Herzstillstand künstlich beatmet: von einer T-Kanüle, die bei Beginn des Versuchs in die Trachea eingeführt wurde, wird das eine Ende mit einem kurzen offenen Gummischlauch verbunden, der zur Expiration dient, das andere Ende mit einem kleinen Gummigebläse für Handbetrieb. Man betätigt dann die künstliche Atmung mit der Hand: Inspiration: Blasen unter Zuhalten des Expirationsendes zwischen 2 Fingern; Expiration: einfaches Loslassen der beiden Finger. Diese Methode hat sich ausgezeichnet bewährt und eignet sich gut zur Beobachtung des richtigen Herztodes.

Die Äthernarkose konnte bald nach Versuchsbeginn abgesetzt werden, da der infundierte Alkohol die Narkose unterstützte.

Tabelle 6. Infusion von 1‰iger Digitoxinlösung in 40%igem Alkohol.

Gewicht des Tieres	Infundierte Flüssigkeitsmenge	mg	mg/kg	Zeit
		a) Rasche Infusion:		
215	3,15	3,15	14,7	17 Min.
260	2,0	2	7,7	15 „
240	1,75	1,75	7.3	12 „
235	2,85	2,65	11,27	20 „
240	2,75	2,75	11,48	22 „
220	3,10	3,10	14,09	30 „
210	3,10	3,10	14,5	24 „
		Durchschnittswert:	11,57	20 Min.
		b) Langsame Infusion:		
260	3,1	3,1	12	54 Min.
330	6,35	6,35	19,05	78 „
260	3,45	3,45	13,27	58 „
150	2.6	2,6	16,0	80 „
155	3,05	3,05	18,1	85 „
155	2,33	2,33	15,03	70 „
135	2,25	2,25	16,6	72 „
170	2,65	2,65	15,55	65 „
170	2,2	2,2	12,94	58 „
170	2,8	2,8	16,4	81 „
170	2,4	2,4	14,12	70 „
330	5,2	5,2	16,0	80 „
		Durchschnittswert:	15,45	71 Min.

Eine große Reihe von Versuchen konnte nicht verwertet werden, da das Digitoxin in der verwendeten Lösung immer wieder auskristallisierte oder beginnende Kristallisation die Kanüle verstopfte. Durch Warmhalten der Lösung gelang es, wenigstens die Hälfte der angesetzten Versuche zu Ende zu führen.

Während also die letale Dose bei rascher Infusion (20 Minuten bis zum Herztod) in Übereinstimmung mit Heubner und Nyary zu 11,57 mg/kg gefunden wurde, ergibt sich aus 12 Infusionsversuchen mit langsamer Infusion (im Mittel 70 Minuten bis zum Herztod) ein Durchschnittswert der letalen Dose von 15,45 mg/kg. Wir müssen also feststellen, daß die letale Dose auch bei der Ratte von der Infusionsgeschwindigkeit abhängig ist und sind der Ansicht, daß auch diese Resultate für eine Fähigkeit der Ratte, das Digitoxin zu entgiften, sprechen.

Bereits oben angeführte Gründe bezüglich der Schwerlöslichkeit des Digitoxins und die Beobachtung, daß die infundierten Flüssigkeitsmengen den Kreislauf überlasten können, und die Feststellung, daß diese hohe Alkoholkonzentration leicht zu einer Trombosierung der Venen führt, haben uns veranlaßt, nach geeigneteren Lösungsmitteln für den Zweck der Infusion zu suchen. Außerdem wurde wiederholt die Beobachtung gemacht, daß gerade bei langsamer Infusion das durch den ziemlich ausgeprägten Venenpuls der Ratte stoßweise in die Kanüle getriebene Blut besonders zur Gerinnung neigt. Um allen diesen Mängeln grundsätzlich abzuhelfen, wurde nach einigen Vorversuchen folgende Mischung als geeignet befunden:

10 mg Digitoxin in
0,25 ccm Methylpiperidon = 5%.
2,25 „ Alkohol = 45%.
2,0 „ 0,9%ige Kochsalzlösung = 40%.
0,5 „ 5%ige Heparinlösung (= 25 mg = 1000 Roche-Einheiten) = 5%.

5 ccm 2‰ige Digitoxinlösung.

Mit dieser Mischung, die den Vorteil einer Verminderung des zu infundierenden Alkohols um fast 50% hat, gelangen alle Infusionen tadellos. Zu beachten war allerdings, daß nach etwa einer halben Stunde das gesamte Blut des Tieres ungerinnbar wurde und es aus den Schnittstellen am Halse erneut zu bluten begann. In diesem Falle wurden die blutenden Stellen mit gutem Erfolg mit einer glühenden Sonde verschorft. Eine geringere Heparinmenge erwies sich als ungenügend. Die angegebene Lösung ist etwa 12 Stunden lang gebrauchsfähig. Dann beginnt eine Ausfällung des Heparins durch den Alkohol. Die Herstellung der Lösung erfolgt zweckmäßig unter leichtem Erwärmen. In den folgenden Versuchen sind die Bedingungen dieselben mit der alleinigen Ausnahme, daß es sich hier, wie besonders betont werden muß, um eine 2%ige Digitoxinlösung handelt. Auf die Fortsetzung der Beatmung nach Eintritt des ersten Herzstillstandes wurde verzichtet, da nach gemachten Beobachtungen die Zeit zwischen primärem und dem endgültigen Herzstillstand bei künstlicher Beatmung nur 1—3 Minuten betrug.

Tabelle 7. Infusion einer 2‰igen Digitoxinlösung in 45%igem Alkohol plus 5% Methylpiperidon.

Gewicht des Tieres	Infundierte Flüssigkeitsmenge	mg	mg/kg	Zeit
		a) Rasche Infusion:		
225	2,65	5,3	23,5	22 Min.
235	3,575	7,15	30,42	27 „
167	2,255	4,55	27,24	23 „
186	1,875	3,95	21,23	20 „
195	2,125	4,25	21,79	19 „
		Durchschnittswert:	24,85	22,2 Min.
		b) Langsame Infusion:		
270	2,3	4,6	31,8	44 Min.
350	3,35	7,7	36,6	75 „
330	3,1	6,2	33,54	62 „
215	3,75	7,6	35,34	85 „
175	3,75	5,7	32,0	60 „
214	3,45	6,9	32,24	67 „
		Durchschnittswert:	31,92	65,5 Min.

Die Entgiftung bei der 2‰igen Lösung ist demnach deutlich stärker, denn wir finden sowohl bei langsamer wie bei rascher Infusion die Dosis bis zum Eintritt des Herzstillstandes doppelt so hoch wie mit der 1‰igen Lösung. Außerdem haben wir bei 22,2 Minuten durchschnittlicher Infusionszeit 24,85 mg/kg erreicht, während bei 65,5 Minuten Infusionszeit die beachtliche Höhe von 31,2 mg/kg erreicht wurde. Somit hat bei dieser Lösung die Ratte in 65 Minuten 7,07 mg/kg entgiftet — während sie bei Infusion der 1‰igen Lösung nur 2,88 mg/kg entgiftete —, das bedeutet gegenüber der 1‰igen Lösung eine Steigerung auf mehr als das Doppelte. Der so berechneten Entgiftung entspricht auch die mit 2‰iger Lösung gegenüber der 1‰ gefundene etwa doppelte letale Dose.

Besonders auffällig erscheint, daß auch bei sehr langsamer Infusion 30 und mehr mg pro kg erst letal sind, während bei der Injektion innerhalb etwa 1 Minute ungefähr 3 mg/kg tödlich sind, vorausgesetzt, daß man wartet, bis der Tod eintritt („zeitlose" letale Dose). So wird auf 1 Stunde verteilt das 5—10fache der Dose ertragen, die innerhalb 1 Minute injiziert letal ist.

Diese Ergebnisse sprechen also für eine recht rasche Entgiftung. Sie stimmen auch mit dem Befund überein, daß die subcutane Injektion soviel weniger giftig wirkt wie die intravenöse. Man steht hier hinsichtlich der Schlußfolgerungen im Gegensatz zu Heubner und Nyary, aus deren Versuchen eine auffallend geringe Entgiftung zu folgern war. Außerdem wäre also doch nicht — auch nicht innerhalb 1—2 Stunden — die absolute Giftmenge für den Verlauf der Vergiftung allein entscheidend, wie man bei der alten Annahme der langen Stabilität (Speicherung) des Digitoxins anzunehmen gezwungen ist, wenn man eine lange Speicherung des Digitoxins

als maßgebend betrachtet, sondern die Konzentration, die, wenn auch vorübergehend, im Blute bzw. Herzmuskel erzielt wird. Da nach den oben beschriebenen Befunden eine Speicherung in Verbindung mit der raschen Zerstörung des Glykosids im Rattenblute (4) auch nur für Stunden bei der Ratte in Wegfall käme, kämen wir damit noch weiter von der alten Theorie der Digitaliswirkung ab und müßten so etwas wie eine durch die Anfangskonzentration des Digitoxins bewirkte schwerreversible funktionelle oder nach Heubner allobiotische Veränderung, sei es der Muskelfaser, sei es der ernährenden Koronargefäße, heranziehen, die nach Beseitigung des Giftes fortbesteht.

Andererseits scheint auch die Größe der Entgiftung in gewissem Maße von der Konzentration des angebotenen Giftes abhängig zu sein, wie es auch chemischen Grundregeln entsprechen würde, in dem Sinne, daß, je stärker die Konzentration, desto größer und intensiver die Entgiftungsvorgänge sind. Anders kann man die Unterschiede der Erträglichkeit und der entgifteten Menge zwischen $1^0/_{00}$ und $2^0/_{00}$iger Lösung nicht erklären, zumal, wie Tabellen 6 und 7 zeigen, die absoluten Mengen der mitinjizierten, nicht ungiftigen Lösungsmittel in den beiden Versuchen nicht wesentlich differieren.

Es ist von Colldahl an cyklaminisierten Kaulquappen festgestellt worden (10), daß die primäre Digitoxinlösung sehr leicht auswaschbar ist, daß also das, was irreversibel bleibt oder wird, auf Sekundärschäden beruhen muß. Nach der angeführten Arbeit kann auch Digitoxin nur minutenlang im Herzen anwesend sein, und alles, was danach übrigbleibt, sind sekundäre Folgen und nicht direkte Wirkungen noch gegenwärtigen Glykosides. In Verbindung damit und aus unseren Befunden fallen alle alten Speicherungstheorien und es bleibt nichts übrig als momentane Schäden durch einen Konzentrationsstoß und deren sekundäre Folgen.

Wir haben zwei nebeneinander herlaufende Vorgänge, die die Ergebnisse unserer Versuche grundsätzlich beeinflussen, und die beide bei Digitoxin im wesentlichen Gegensatz zu anderen Giften relativ langsam verlaufen. Das ist einerseits die Entgiftung des Digitoxins, im wesentlichen wohl als chemischer Abbauvorgang zu betrachten; dieser Vorgang bewirkt, daß bei langsamer Infusion höhere letale Dosen zu finden sind als bei rascher. Demgegenüber steht die Entwicklung der Vergiftungserscheinungen, die wir nicht mehr als in einer einfachen Konzentrierung des Giftes an einem bestimmten Wirkungsort begründet auffassen können, sondern die auf komplizierteren, funktionellen oder molekularen, schließlich möglicherweise sogar mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen beruhen, die wir vorläufig noch nicht genügend kennen und die von Heubner als „allobiotisch" bezeichnet werden. Diese Erscheinungen nehmen im Gegensatz zu den Folgen der Entgiftung in der Zeit zu und bewirken, daß wir bei längerer Beobachtung die letalen Dosen wesentlich kleiner finden als bei zeitgebundener kurzer Versuchsdauer. Das Nebeneinander dieser

beiden in ihren Folgen entgegengesetzten Vorgänge bei der Digitoxinvergiftung erschwert begreiflicherweise die Analyse dieser Wirkungen erheblich. Es geht jedoch aus diesem Nebeneinander hervor, daß die durch die Infusion bis zum Herztod festgestellte Dose bei zeitloser Beobachtung immer größer sein muß als die kleinste letale Dose.

IV. Intravenöse Infusion und zeitlose Beobachtung.

Zur Demonstration dessen und auch, um noch auf andere Weise ein Maß für die Größe der Entgiftungsvorgänge im Rattenorganismus zu gewinnen, wurde eine erneute Versuchsserie angesetzt. Dabei wurde wie oben beschrieben verfahren, eine bestimmte Digitoxinmenge langsam infundiert, dann nach einer gewissen Zeit die Infusion abgebrochen, die Kanüle entfernt und die Tiere wieder zugenäht. Sie wurden dann an einem etwa 30° warmen Ort untergebracht. Bei diesen Versuchen wurde die Dosis der für die Narkose bestimmten Urethanmenge möglichst gering gehalten und mehr Äther gegeben, denn es zeigte sich, daß bei den üblichen Urethandosen die Tiere zwar 24—48 Stunden noch am Leben blieben, aber nicht mehr erwachten und schließlich starben. Die Versuche wurden so geleitet, daß die Tiere nach 12—18 Stunden wieder wach wurden. Auf die Pflege der operierten Tiere wurde die größte Sorgfalt verwandt. Die Beobachtungszeit erstreckte sich über 14 Tage.

Tabelle 8. Langsame Infusion und zeitlose Beobachtung.

Gewicht des Tieres	Infundierte Flüssigkeitsmenge	mg	mg/kg	Zeit Min.	Lösung ‰	Tod nach
300	1,8	1,8	5,99	36	1	7 Stunden
290	1,85	1,85	6,419	38	1	7 „
290	1,8	1,8	6,346	35	1	überlebt
185	0,925	0,925	5	26	1	7 Stunden
190	0,95	0,95	5	30	1	überlebt
165	0,825	0,825	5	38	1	30 Stunden
170	0,85	0,85	5	40	1	24 „
195	0,975	0,975	5	30	1	24 „
195	0,5	1	5	20	2	4 Tagen
190	0,475	0,95	5	30	2	3 „
245	0,64	1,125	5	30	2	überlebt
132	0,33	0,66	5	22	2	„
260	0,662	1,325	5	20	2	4 Tagen
270	0,56	1,12	4,15	26	2	überlebt
290	0,55	1,1	3,8	25	2	„
350	6,15	1,23	3,65	33	2	„

Man sieht hier, daß Bruchteile der bei einstündiger Infusion tödlichen Mengen bei längerer Beobachtung noch zum Tode führen. Andererseits ist ersichtlich, daß Dosen, die bei der Injektion während einer Minute mit Sicherheit zum Tode führen, hier bei über etwa 20 Minuten dauernder Infusion bereits ertragen werden, was als Beweis der Entgiftung angesehen werden kann. Interessant ist, daß auch hier die 5 mg/kg in 2‰iger Lösung für die

Tiere deutlich weniger toxisch waren als dieselbe Menge in 1‰iger Lösung. Auch hier scheint die Entgiftungsleistung unter anderem auch von der Giftkonzentration abzuhängen.

Es ist schwer möglich, aus diesen Versuchen sehr weitgehende Schlüsse zu ziehen, denn wir können schon den Einfluß der Narkose und der infundierten Lösungsmittel nicht als völlig belanglos annehmen. Aus dem Vergleich der verschiedenen Versuchsreihen ergibt sich aber die Überlagerung der verschiedenen Faktoren, vor allem der Entgiftung einerseits, der Dauer bis zum Eintritt der vollen Wirkung (Zeitfaktor) andererseits. Beide Faktoren sind erwiesen. Es ist aber durch die Interferenz derselben sehr schwer abzuschätzen, inwieweit der eine oder andere überwiegt.

Zusammenfassung.

An Hand verschiedener Methoden wurde die bisher angezweifelte Entgiftungsfähigkeit der Ratte für Digitoxin dargetan. Des weiteren wurde die Abhängigkeit der Entgiftungsgröße von der Konzentration bewiesen.

1. Die letale Dose des Digitoxins für die Ratte bei subcutaner Injektion ist etwa 100 mg kg, jedoch sehr stark von den Resorptionsbedingungen abhängig. Durch Vergrößerung der Resorptionsfläche durch Injektion an mehreren Hautstellen sinkt die letale Dose beträchtlich bis gegen 18 mg/kg.

2. Die intravenöse letale Dose bei zeitloser Beobachtung ist 3 mg/kg.

3. Nach dem Vorgehen von Heubner und Nyary wurde die tödliche Menge bei Infusionsdauer von etwa 20 Minuten bei 11,5 mg/kg bestätigt. Bei einer Infusionsdauer von 70 Minuten wurden 15,45 mg kg Durchschnitt errechnet, was bereits für eine Entgiftung spricht.

4. Bei Dauerinfusion mit doppelter Digitoxinkonzentration (2‰) ergab sich bei 22 Minuten Infusionsdauer eine letale Dose von 24,85 mg kg Durchschnitt, und bei 65 Minuten eine von 31,92 mg kg. Damit dürfte eine Entgiftung des Digitoxins bei der weißen Ratte als erwiesen gelten.

5. Bei Dauerinfusion einer festen Dose und zeitloser Beobachtung wurde Entgiftungsfähigkeit der Ratte für Digitoxin bestätigt, aber auch festgestellt, daß die Infusion bis zum Herztod Dosen ergibt, die wesentlich höher sind als die bei zeitloser Beobachtung letal gefundenen.

Literatur.

1) Hatcher: Arch. internat. Med. **10**, 268 (1910). — 2) Fromherz u. Bauer: Klin. Wschr. **1927**, Nr. 25; Bauer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 699 (1933). — 3) Heubner u. Nyary: Ebenda **177**, 62 (1935). — 4) Straub: Ebenda **84**, 223 (1919). — 5) Straub: Ebenda **84**, 228 (1919). — 6) Genuit: Ebenda **188**, 285 (1938); Genuit u. Eschbach: Ebenda S. 302. — 7) Bauer: Ebenda **176**, 74 (1934); Büchner: Ebenda S. 59; Büchner: Verh. dtsch. path. Ges. **28**, 188 (1935). — 8) Loeb u. Loewe: Ther. Mh. 1916, S. 74; Heubner: Klin. Wschr. **1923**, S. 2037. — 9) Straub: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 453 (1937). — 10) Colldahl: Skand. Arch. Physiol. **78**, 59 (1938); **15**, 171 (1936).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Zur Biologie des 2, 4-Diaminoazobenzols.

Beobachtungen über das chemische Verhalten des Azorhodans.

Von

H. Riedel.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. November 1939.)

Das Azorhodan, das von Haack (1) einer eingehenden pharmakologischen Untersuchung unterzogen und auf dessen Besonderheiten bei der Ausscheidung in den Harn in einer eigenen früheren Arbeit (2) hingewiesen wurde, beginnt seit einiger Zeit klinisches Interesse zu beanspruchen. Dieser Anspruch wird durch die guten Erfahrungen gerechtfertigt, die mit anderen Derivaten des 2. 4-Diaminoazobenzols, wie „Azohel" und „Azojod" gemacht wurden. So findet Azohel mit Erfolg bei Infektionen der Rachenorgane, Azojod mit Erfolg bei infizierten Wunden, Furunkulose, luischer Angina und Fäulnisdyspepsie Anwendung (3).

Dem Azorhodan, Azohel und Azojod liegt nach Angaben des Herstellers* eine Azoverbindung als Base zugrunde, die 1876 von Witt (4) aus diazotiertem Anilin und m-Phenylendiamin zuerst dargestellt wurde:

Diese Verbindung wird schlechthin als Chrysoidinbase bezeichnet. Ihr wissenschaftlicher Name ist 2, 4-Diaminoazobenzol.

Während beim Azohel die 2-Aminogruppe mit

$C_6H_8O_7$

„Azohel".

Citronensäure, die 4-Aminogruppe mit Chlorwasserstoffsäure besetzt ist,

HJ

„Azojod"

* Dr. med. Hubold u. Bartsch, Grünheide (Mark).

tragen beim Azojod beide Aminogruppen je ein Molekül Jodwasserstoffsäure. Das Azorhodan ist dagegen ein Monosalz des 2, 4-Diaminoazobenzols; nur die 4-Aminogruppe ist mit einem Molekül Rhodanwasserstoffsäure besetzt:

NH_2

„Azorhodan".

Das Azorhodan besteht mikroskopisch aus tiefdunklen schwarzroten Nädelchen, für deren Kristallstruktur ein abgerundetes Kantenende charakteristisch ist.

Der Schmelzpunkt war nicht scharf zu bestimmen, da in der Gegend von 115°, in der man beginnendes Schmelzen wahrzunehmen glaubte, bereits Zersetzung eintrat, die sich im Niederschlag von dunkelroten Tröpfchen oberhalb des schmelzenden Materials zu erkennen gab. Löslichkeit: 1 Teil 2, 4-Diaminoazobenzolmonorhodanid war bei 18° in ungefähr 5000 Teilen Wasser löslich. Bei 45° wurde die Löslichkeit zu 1 : 2600 bestimmt. Beim Abkühlen schieden sich aus dieser Lösung wieder Azorhodannädelchen ab. In Methyl-, Äthyl-, Butyl-, Amylalkohol und Aceton löste sich Azorhodan sehr gut. In Benzol und seinen Homologen sowie Petroläther war es unlöslich. In gewöhnlichem Leitungswasser überzogen sich die Kriställchen sofort mit einer gelben Schicht, die jede weitere Auflösung verhinderte und aus einem basischen Produkt bestand. Wurden zu 1 Liter gesättigter Farbstofflösung 9 g Kochsalz gegeben, so war auch nach mehrtägigem Stehen keine Ausscheidung von Kriställchen zu beobachten.

Abb. 1.

Lichtabsorption. Die Lösung 1 : 5000 sieht tief orangerot aus. Bei spektroskopischer Betrachtung war in einer Schichtdicke von 5 cm von Orangegelb nach Violett hin alles ausgelöscht. Diesem Befund entsprach die Absorptionskurve Nr. 1, Abb. 2, die mit dem Zeiss-Ikon-Spektralphotometer aufgenommen wurde. Verdünnte Azorhodanlösungen haben einen gelblichen Farbton. Die Lichtabsorption einer Verdünnung 1 : 83000 bei verschiedenen Wellenlängen zeigt Kurve Nr. 2, Abb. 2.

Verhalten gegen verschiedene chemische Einwirkungen: Nach Zusatz von wenig Mineralsäure, wie Salzsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure zur gelben verdünnten Azorhodanlösung trat deutliche Farbvertiefung nach Rot ein. Hier entstanden wahrscheinlich die sehr intensiv färbenden und gut wasserlöslichen mineralsauren Salze.

Nach Zusatz von Natronlauge, Kalilauge oder Ammoniumhydroxydlösung zur konzentrierten wässerigen Azorhodanlösung flockte ein gelber Körper aus. Dieser gelbe Stoff war zum geringen Teil in siedendem Wasser löslich. Während des Abkühlens schieden sich mikroskopisch elliptisch geformte Nädelchen ab. Der gelbe Körper war sehr gut in Methanol, Äther, Chloroform, Benzol und Petroläther löslich. Der Schmelzpunkt lag zwischen 159 und 160° unkorr. Man sollte erwarten, daß es sich um die Base des Azorhodans, das 2, 4-Diaminoazobenzol handelte. In den gelben Nädelchen schien jedoch ein anderer Stoff vorzuliegen, denn der Schmelzpunkt des 2, 4-Diaminoazobenzols wird mit 117° angegeben (5).

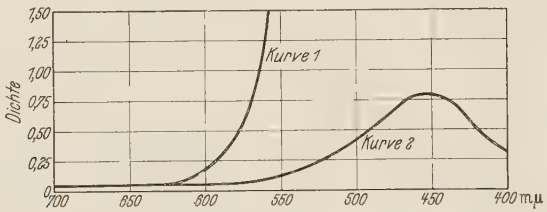


Abb. 2.

Wurden zu 50 ccm konzentrierter Farbstofflösung 10 ccm der zu jedem p_H-Wert gehörigen Sörensen-Phosphatpufferlösung gegeben, so trat folgende Reaktion ein.

p_H-Wert	Reaktion
8,3	Sofortige Flockung
7,35	Sofortige Flockung
6,6	Sofortige Flockung
5,6	Nichts
4,5	Nichts

Beim Einbringen der wässerigen Azorhodanlösung in die Blutbahn müßte demnach sofortige Flockung eintreten. In einem Versuch, in dem 10 ccm Katzenblutserum mit 10 ccm der in 0,9 % NaCl gesättigten Farbstofflösung vermischt wurden, war jedoch im Verlauf von 24 Stunden keine Trübung oder Flockung zu beobachten. Wahrscheinlich verhinderten die anwesenden Kolloide eine Ausfällung.

Das Verhalten der Lichtabsorption verdünnter Azorhodanlösungen bei verschiedenen p_H-Werten zeigt Abb. 3.

Hier wurden 1,5 ccm der gesättigten Farbstofflösung mit 5 ccm Phosphatpuffer und 20 ccm Wasser verdünnt und die Absorptionskurven ausgemessen. Bei p_H 8,3 war die Lichtabsorption viel geringer als bei p_H 4,5. Die horizontale Verschiebung der Absorptionsmaxima konnte in diesem Versuch nicht bewertet werden, weil die geringe Empfindlichkeit des menschlichen Auges in dem gerade in Betracht kommenden Spektralbereich eine genaue Ausmessung verhindert.

Azorhodanlösungen sind nicht kochbeständig. Nach 4-stündigem Kochen am Rückflußkühler war etwa ein Drittel des Farbstoffs zerstört.

Durch Reduktionsmittel, wie naszierenden Wasserstoff oder $Na_2S_2O_4$-Lösung wurde die Azorhodanlösung entfärbt, was dem allgemeinen Verhalten der Azoverbindungen bei der Reduktion entsprach (6).

Nach Zusatz von Perhydrollösung zur konzentrierten wässerigen Lösung war keine Veränderung zu bemerken.

Pikrinsäure erzeugte mit Azorhodan eine Fällung. Die Empfindlichkeit der Reaktion wurde in folgendem Versuch geprüft. Es wurden Azorhodanverdünnungen hergestellt und zu je 5 ccm Verdünnung je 5 ccm konz. wässeriger Pikrinsäurelösung gegeben. Nach 30 Min. wurde beobachtet:

Verdünnung	Reaktion
1 : 5000	Fällung
1 : 10000	Fällung
1 : 20000	Schwächere Fällung
1 : 40000	Feinste Flöckchen, deutlich
1 : 80000	Feinste Flöckchen, gerade noch zu erkennen
1 : 160000	Nichts

Pikrolonsäure erzeugte in Azorhodanlösung ebenfalls Fällung.

Diese wenigen Anhaltspunkte geben einen ungefähren Überblick über das chemische Verhalten des 2, 4-Diaminoazobenzol-monorhodanids. Für die therapeutische Anwendung ist vor allem zu berücksichtigen, daß die Löslichkeit des

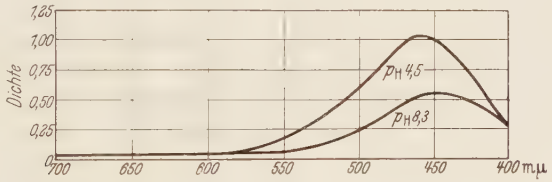


Abb. 3.

Azorhodans ziemlich gering ist und bei der Herstellung von wässerigen Lösungen keinesfalls über 45° erhitzt werden darf, weil sonst Zersetzung eintritt. Spontane Zersetzung von monatelang bei Zimmertemperatur aufbewahrten Lösungen wurde nie beobachtet. Die Empfindlichkeit des Azorhodans gegen Reduktion wird sich in allen Versuchen bemerkbar machen, in denen Azorhodan auf dem Wege des Magendarmkanals in den Dickdarm gelangt und dort den reduzierenden Einflüssen der Darmbakterien ausgesetzt ist. Bei Untersuchungen über die Ausscheidung des Azorhodans wird deshalb von vornherein zu erwarten sein, daß nur ein Teil der aufgenommenen Menge durch den Kot oder in den Harn ausgeschieden, und der Rest abgebaut werden wird. Nach der direkten Einbringung von Azorhodan in tierisches Gewebe ist wegen der dort herrschenden schwach alkalischen Reaktion mit allmählicher Ausfällung des oben beschriebenen bei 159—160° schmelzenden Körpers zu rechnen. Die Alkaliempfindlichkeit des Azorhodans verbietet auch die Verwendung von Leitungswasser zur Herstellung von äußerlich anwendbaren Lösungen. Als Lösungsmittel kommen hier nur dest. Wasser oder z. B. Glycerin in Frage.

Die Fällungsreaktion, die nach dem Zufügen von Pikrinsäure oder Pikrolonsäure zu Azorhodanlösungen auftritt, kann vielleicht für Versuche von Wert sein, in denen es darauf ankommt, einen direkten Nachweis von Azorhodan in Körperflüssigkeiten zu führen.

Zusammenfassung.

Es wurden einige Beobachtungen über das chemische Verhalten des Azorhodans mitgeteilt und kurze praktische Hinweise für das Arbeiten mit dieser Substanz gegeben.

Literatur.

1) Haack, H. J.: Pharmakologische Untersuchungen über Azorhodan. Dissertation (Halle) 1939. — 2) Riedel, H.: Versuche über die Ausscheidung einiger Azokörper. Dissertation (Berlin) 1937. — 3) Lockemann, G., u. W. Ulrich: Dtsch. med. Wschr. **1934**, S. 395; G. Linde: Ebenda **1934**, S. 397; Dietrich: Zahnärztl. Rdsch. **1935**, Nr. 21; F. Kastner: Azohel- und Azojodpräparate, ihre bakterizide Wirkung und ihre Anwendung in der zahnärztlichen Praxis. Dissertation (Köln) 1937. — 4) Vgl. hierzu das Lebensbild O. N. Witts von Nölting: Ber. dtsch. Chem. Ges. **49**, 1763 (1916). — 5) Beilstein: Bd. XVI., S. 383.- 6) Karrer, P.: Lehrbuch der org. Chemie, S. 484, 4. Aufl. Verlag Thieme, 1936.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. (Direktor: Prof. Dr. L. Lendle.)

Stufenphotometrische Bestimmungen verschiedener herzwirksamer Glykoside und Genine und Beurteilung ihres Reinheitsgrades.

Von

A. Hagemeier.

(Eingegangen am 10. November 1939.)

Der zuverlässige, quantitative chemische Nachweis von kleinen Mengen der Digitalisglykoside ist noch nicht gelungen. Neuere Bemühungen, auf Grund der Farbreaktion der Glykoside mit alkalischer Pikrinsäure (nach Baljet[1]) den Glykosidgehalt der Blätter sicher zu ermitteln (Knudson und Dressbach[2]), sind gescheitert. Die Reaktion, die an die ungesättigte Lactongruppe der Genine gebunden ist (vgl. Jacobs[3], Neumann[4], Lendle und Schmelzer[5]), entspricht der bekannten Jaffeschen Reaktion, die auch in unspezifischer Weise von anderen Stoffen mit aktivem Wasserstoffatom gegeben wird. Es ist daher kaum möglich, die Digitalisglykoside damit quantitativ neben organischen Gewebsbestandteilen nachzuweisen.

Für quantitative Untersuchungen mit reinen Glykosidlösungen eignet sich dagegen diese Bestimmungsmethode sehr wohl. Lendle und Pusch[6] haben sie z. B. zur Adsorptionsmessung der Glykoside an anorganischem Substrat verwendet. Hauschild[7] hat diese Methode dann für die stufenphotometrische Kolorimetrie unter Ermittlung einiger Farbfaktoren ausgebaut. In der gleichen Weise hat auch Neumann[4] diese Methode verwertet und dabei einige interessante Ergebnisse über das Verhalten verschiedener Glykoside und ihrer Genine gefunden. Bei der Prüfung von Digitoxin, Cymarin und ihrer Genine, sowie von einigen weiteren Strophanthinderivaten, Gitoxigenin und g-Strophanthin fand er, daß äquimolare Lösungen dieser Stoffe eine gleiche maximale Extinktion lieferten. Nach diesen Befunden schließt Neumann[4], daß man mit Hilfe einer genau definierten Lösung eines einzigen Stoffes eine Eichungskurve anlegen und nach dieser dann alle anderen Verbindungen bestimmen kann.

Eine solche vereinfachte Übertragung des Verfahrens setzt freilich voraus, daß bei den zu prüfenden Stoffen schon chemisch reine, einheitliche Individuen vorliegen, da alle Eingriffe am Molekül, die die ungesättigte

[1] Baljet, Schweiz. Apotheker-Ztg. **56**, 71 (1918). — [2] Knudson u. Dressbach: J. Pharmacol. (Am.) **19**, 389 (1922). — [3] Jacobs, A.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **23**, 213 (1925). — [4] Neumann, W.: Hoppe-Seylers Z. **240**, 241 (1936). — [5] Lendle, L., u. W. Schmelzer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **177**, 622 (1935). — [6] Lendle, L., u. Fr. Pusch: Ebenda **177**, 551 (1935). — [7] Hauschild, F.: Ebenda **179**, 255 (1935).

Lactongruppe betreffen, die Farbintensität beeinträchtigen können. Ferner müssen Beimischungen von zuckerärmeren Geninfraktionen die Farbtiefe verstärken. Es ist aber noch keineswegs endgültig sichergestellt, daß die sogenannten Reinglykoside tatsächlich immer in absolut einheitlichen und stabilen Chargen gewonnen werden. Die diesbezüglichen Schwierigkeiten auf diesem Gebiete der Digitalischemie sind ja durch die Arbeiten von Cloetta, Windaus und Stoll gerade deutlich gemacht worden.

Wir stellten uns nun die Frage, ob man den Reinheitsgrad der Glykoside – auch ohne biologische Auswertungen, die ja auch immer nur Interferenzwerte liefern können – mit dieser Baljetschen Reaktion kontrollieren kann. Ausgangspunkt für diese Fragestellung war eine direkte Beobachtung, daß zu verschiedenen Zeiten bezogene Reinfraktionen von Digitoxin wohl biologisch gleichwertig waren, aber bei kolorimetrischer Bestimmung deutliche Abweichungen des Farbfaktors geliefert hatten.

Im Laufe dieser Untersuchungen erwies es sich als notwendig, auch von einer größeren Anzahl verschiedener Glykoside und Digitaloide den Farbfaktor zu bestimmen, eine Arbeit, die sich aber lohnte im Hinblick auf deren weitere Verwendung im Rahmen der folgenden Untersuchungen über die verschiedene Bindungsfähigkeit solcher Wirkstoffe an die Serumeiweißkörper.

I. Methodik.

Zu unseren Untersuchungen stand ein Stufenphotometer der Firma Zeiss zur Verfügung*. Wir bedienten uns dabei der Methode der Differenzspektrophotometrie, wie sie auch von Hauschild[7] und Neumann[4] für Digitalisverbindungen angewandt wurde. Die benutzten Küvetten hatten eine Schichtdicke von 20 mm. Als Vergleichslösung diente eine 0,25%ige Pikrinsäurelösung, die auf der einen Seite im Strahlengang des Photometers stand. Auf die andere Seite brachten wir die zu untersuchende Lösung, die nach den Vorschriften von Knudson und Dressbach[2] hergestellt wurde. Eine bestimmte Menge einer bekannten Glykosidlösung versetzten wir mit der gleichen Menge einer alkalischen Pikrinsäure, die sich aus 19 ccm einer 1%igen Pikrinsäure und aus 1 ccm 10%iger Natronlauge zusammensetzte. Dabei beobachteten wir die von Neumann[4] gemachten Erfahrungen, daß nämlich das Maximum der Farbtiefe sowohl von der Zeit als auch von der Temperatur abhängig ist. Wir fanden diese Erfahrungen bestätigt, namentlich beim Strophanthin, und zwar erreichten vor allem die starken Konzentrationen ihre größte Farbtiefe viel schneller als die schwachen, um dann aber auch viel schneller wieder abzublassen. Wir machten also die Ablesungen am Stufenphotometer bei 20° C und im Maximum der Farbtiefe, d. h. nach etwa 15—20 Minuten.

Um möglichst genaue Ergebnisse zu erzielen, wurden von jeder Lösung 10 Ablesungen an der Meßtrommel gemacht und daraus der Mittelwert errechnet. Dieser Wert drückt in Prozenten die Lichtdurchlässigkeit der Untersuchungslösung aus und heißt daher Durchlässigkeit = $D\%$. In Tabelle 1 ist die Bestimmung des Mittelwertes der Durchlässigkeit von vier bekannten Digitoxinlösungen verschiedener Konzentrationen gezeigt. Die Streuung solcher Ablesungen ist gering, der mittlere Fehler der Abweichung beträgt nur 0,15 bis 0,34 (Tabelle 1).

* Das in dieser Arbeit verwendete Stufenphotometer der Firma Zeiss, Jena, wurde uns von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Tabelle 1. Digitoxin 1938.

mg%	D%										Mittelwert
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	
0,5	45,1	44,8	45,0	44,6	44,8	45,0	44,8	44,6	45,0	45,0	44,87
1,0	42,1	41,8	41,9	41,8	41,7	41,8	41,2	41,9	40,9	41,0	41,59
2,0	36,0	35,1	36,0	35,5	35,8	35,2	35,6	36,0	36,1	35,7	35,70
4,0	27,2	26,9	27,0	26,5	26,8	26,5	26,9	26,2	26,4	26,8	26,72
Leerwert	47,8	48,0	49,2	48,8	49,1	49,0	49,2	48,0	48,9	48,8	48,68

Zu diesen Mittelwerten der Durchlässigkeit suchten wir nun in der dem Photometer beigefügten Tabelle die Extinktionen auf. Die Extinktion = E ist der negative Logarithmus der Durchlässigkeit und ist der Schichtdicke und der Konzentration direkt proportional. Bezogen auf die Schichtdicke von 1 cm nennt man sie Extinktionskoeffizient = k. Wir dividierten also die gefundenen Extinktionen durch 2 und erhielten so die Extinktionskoeffizienten. Durch Subtraktion des sogenannten Leerwertes von dem Extinktionskoeffizienten ergab sich dann die reduzierte Extinktion = E red. Der Leerwert ist die Durchlässigkeit der alkalischen Pikrinsäure gegenüber der Vergleichslösung. Er wurde festgestellt, indem wir destilliertes Wasser und alkalische Pikrinsäure zu gleichen Teilen mischten und im Stufenphotometer die Durchlässigkeit bestimmten. Endlich fanden wir dann durch Division der bekannten Glykosidkonzentration durch die reduzierte Extinktion den Farbfaktor = F. Aus den bei der Bestimmung etwas voneinander abweichenden Werten der Faktoren eines Glykosids errechneten wir den mittleren Faktor. Ist einmal der Faktor eines Stoffes ermittelt, so kann man durch Multiplikation mit der reduzierten Extinktion die Konzentration einer Lösung bestimmen. Tabelle 2 zeigt die Bestimmung der Farbfaktoren der vier Digitoxinlösungen verschiedener Konzentration. Aus diesem Beispiel ist gleichzeitig zu erkennen, mit welcher Genauigkeit solche Bestimmungen durchzuführen sind, denn die Konzentrationen, die wir durch Multiplikation mit dem mittleren Faktor wiederfinden, weichen nur um 0,5—4% von den bekannten Konzentrationen ab (Tabelle 2).

Tabelle 2. Digitoxin 1938.

D%	E	k	E red.	F	Bekannte mg%	Gefundene mg% aus F
44,87	0,348	0,1740	0,0175	28,6	0,5	0,519
41,59	0,381	0,1915	0,034	29,4	1,0	1,006
35,70	0,4475	0,2237	0,06725	29,7	2,0	1,981
26,72	0,5735	0,28675	0,13025	30,6	4,0	3,855
48,68	0,313	0,1565	—		—	—

Mittlerer Faktor: $F = 29{,}6$.

In den Tabellen 3 und 4 ist in gleicher Weise die Bestimmung der Farbfaktoren von Digitoxigenin und g-Strophanthin Güstrow gezeigt. Dabei sind die Fehler noch geringer, beim Digitoxigenin betragen die Abweichungen 0,16—1,5%, beim g-Strophanthin Güstrow 0,4—2,5% (Tabelle 3 und 4).

Tabelle 3. Digitoxigenin.

$D^0/_0$	E	k	E red.	F	Bekannte mg$^0/_0$	Gefundene mg$^0/_0$ aus F
42,3	0,374	0,187	0,0319	15,7	0,5	0,5008
36,5	0,438	0,219	0,0639	15,7	1,0	1,003
27,2	0,5656	0,2827	0,1276	15,7	2,0	2,003
15,2	0,8186	0,4093	0,2542	15,7	4,0	3,99
48,98	0,3102	0,1551	—	—	—	—

Mittlerer Faktor: $F = 15{,}7$.

Tabelle 4. g-Strophanthin-Güstrow.

$D^0/_0$	E	k	E red.	F	Bekannte mg$^0/_0$	Gefundene mg$^0/_0$ aus F
45,2	0,345	0,1725	0,016	31,1	0,5	0,498
42,0	0,377	0,1885	0,032	31,2	1,0	1,025
36,1	0,4425	0,22125	0,06475	30,88	2,0	2,013
27,0	0,569	0,2845	0,128	31,2	4,0	3,970
48,7	0,313	0,1565	—	—	—	—

Mittlerer Faktor: $F = 31{,}1$.

II. Farbfaktoren verschiedener Glykoside.

In der oben beschriebenen Weise wurden die Farbfaktoren für verschiedene Glykoside erster und zweiter Ordnung (Digitaloide) bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Dabei interessierte nun besonders die Frage nach den quantitativen Beziehungen dieser Farbfaktoren in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der Verbindungen. Da nämlich die Farbreaktion an die ungesättigte Lactongruppe gebunden ist, konnte angenommen werden, daß dementsprechend Beziehungen nicht nur zwischen Glykosid und Genin bestehen, worauf schon Lendle und Schmelzer[5] hingewiesen haben, sondern daß auch äquimolare Lösungen verschiedener Glykoside eine gleiche maximale Extinktion liefern müßten. Neumann[4] hat derartige Feststellungen schon getroffen und gibt an, daß man, von einem Stoff ausgehend, nach Anlegen einer Eichungskurve das Molekulargewicht aller anderen Stoffe errechnen kann.

Eine solche Berechnung setzt freilich voraus, daß die zu prüfenden Stoffe in absoluter Reinheit vorliegen, wie auch schon einleitend erwähnt wurde. Umgekehrt könnte aber auch die vorliegende Reaktion Verwertung finden, um bei Kenntnis der molaren Zusammensetzung einer Verbindung ein Urteil darüber zu gewinnen, ob ein vorliegendes Präparat die erforderliche Reinheit besitzt. In Tabelle 5 wurden nun von einer größeren Anzahl von Glykosiden und Geninen die bekannten Molekulargewichte eingesetzt und daraus der zu erwartende Farbfaktor errechnet. Dabei gingen wir vom Digitoxigenin als der vermutlich reinsten und konstantesten Verbindung aus (Tabelle 5).

Tabelle 5.

	Bruttoformel	Molekulargewicht	Faktor errechnet	Faktor gefunden	% der Abweichungen
Digitoxigenin	$C_{23}H_{34}O_4$	374	15,7	15,7	0,0
Digitoxin 1938	$C_{41}H_{64}O_{13}$	764	32,1	31.0	— 3,4
Purpurea Glykosid A	$C_{47}H_{74}O_{18}$	926	38,8	38,3	— 1,3
Digilanid A	$C_{49}H_{76}O_{19} \cdot 1\ H_2O$	987	41,4	39,4	— 4,8
Digilanid B	$C_{49}H_{76}O_{20}$	985	41,3	44,6	+ 8,0
Digilanid C	$C_{49}H_{76}O_{20}$	985	41,3	48,7	+ 17,9
Digitalin	$C_{36}H_{56}O_{14}$	712	29,9	35,7	+ 19,4
Gitoxin	$C_{41}H_{64}O_{14}$	780	32,8	33,5	+ 2,1
Gitoxigenin	$C_{23}H_{34}O_5$	390	16,4	18,5	+ 12,8
Gitalin	$C_{35}H_{56}O_{12}$	668	28,0	36,4	+ 30,0
Oleandrin	$C_{32}H_{48}O_9$	576	24,2	28,1	+ 12,0
k-Strophanthidin	$C_{23}H_{32}O_6 \cdot {}^1/_2\ H_2O$	413	17,3	17,3	0,0
Cymarin	$C_{30}H_{44}O_9$	548	23,0	22,4	— 2,6
k-Strophanthin Boehringer	$C_{36}H_{54}O_{14}$	710	29,8	32,0	+ 7,4
k-Strophanthin Merck	$C_{36}H_{54}O_{14}$	710	29,8	21,3	— 28,5
k-Strophanthosid	$C_{42}H_{64}O_{19}$	875	36,8	37,0	+ 0,5
g-Strophanthin Güstrow	$C_{29}H_{44}O_{12} \cdot 9\ H_2O$	746	31,3	31,1	— 0,6
Quabain Merck	$C_{29}H_{44}O_{12} \cdot 9\ H_2O$	746	31,3	28,5	— 8,9
Convallatoxin	$C_{29}H_{42}O_{10}$	550	23,1	22,6	— 2,2
Adonidosid	noch unbekannt	—	—	47,3	—
Adonivernosid	noch unbekannt	—	—	50,2	—

Vergleicht man die gefundenen Faktoren mit den errechneten, so kann man feststellen, daß sie bei den meisten Stoffen weitgehend übereinstimmen. Zum Teil bestehen allerdings noch Abweichungen von mehr als 5%, die dann wohl gerade als außerhalb der Fehlergrenze betrachtet werden können. Diese Werte liegen zum Teil höher als berechnet, zum Teil auch niedriger. Höhere Werte der Farbfaktoren würden bedeuten, daß die Substanz vielleicht noch mit Stoffen vermischt ist, die keine oder eine geringere Farbreaktion liefern, also vermutlich mit Abbaustufen der Glykoside, die bei den Reinigungsmaßnahmen entstehen können. Wenn der Farbfaktor niedriger als berechnet liegt, muß umgekehrt angenommen werden, daß die Substanz einen Stoff von höherer Farbaktivität enthält, der also die gleiche Lactongruppe in kleinerem Molekül besitzt. Als solche Verbindungen kommen natürlich in erster Linie die etwaigen Geninverbindungen der betreffenden Glykoside in Frage, weil diese bei eingreifenden Reinigungsmaßnahmen während der Darstellung vielleicht auch abgespalten werden können.

Eine befriedigende Übereinstimmung auf 5% ergab sich in obiger Tabelle für folgende Stoffe: Purpureaglykosid A, Digitoxin, Digilanid A, Gitoxin, k-Strophanthidin, Cymarin, k-Strophanthosid, g-Strophanthin und Convallatoxin. Es handelt sich dabei gerade um Stoffe, die neuerdings

von Stoll und Mitarbeitern[8] bei schonendster Darstellung als „genuine" Verbindungen gewonnen worden waren.

Zu niedrige Farbfaktoren, also vielleicht Beimengungen von Geninen, finden sich für Quabain Merck und auch für ein k-Strophanthinpräparat. Für eine Digitoxincharge wurde auch ein Faktor 29,6 gefunden, also eine Abweichung von 7,8%. Man kann versuchen, den etwaigen Anteil der Beimengungen an Genin aus den in der Tabelle 5 aufgenommenen Werten zu berechnen. Es würde sich dann z. B. für die letzterwähnte Digitoxinprobe eine Beimengung von etwa 15% Digitoxigenin annehmen lassen. Für das Strophanthin-Merck würde sich vergleichsweise aber der unwahrscheinliche Wert von einem Geninanteil, welcher größer als 60% ist, berechnen. Diese starke Abweichung läßt sich aber wohl in einfacherer Weise erklären. Nach früheren Angaben nach Lendle und Puhlmann[9] handelt es sich bei dem schwer wasserlöslichen, kristallisierten k-Strophanthin-Merck um ein Cymarinpräparat. In der vorstehenden Tabelle 5 ist der Farbfaktor für Cymarin mit 23,0 errechnet und mit 22,4 gefunden. Mit diesem Wert stimmt nun der gefundene Farbfaktor des k-Strophanthin-Merck wesentlich besser überein.

Zu hohe Farbfaktoren finden sich bei Digilanid B und C, Digitalin, Gitalin, Gitoxigenin, Oleandrin und k-Strophanthin-Boehringer. Von diesen Werten ist besonders das Verhalten des Gitalins zu beachten. Gitalin ist bekannt wegen seiner großen Labilität bei Einwirkung von Wärme und Alkohol („Titersturz" nach Straub[10] vgl. später). Bei unseren Bestimmungen wurden freilich jeweils frisch hergestellte Lösungen verwendet, die bei mehrfachen derartigen Prüfungen den gleichen obigen Farbfaktor lieferten. Nicht verständlich ist bei unseren Ergebnissen die Abweichung des Verhaltens von Oleandrin. Es wurde hier eine Differenz von 12% gegenüber dem berechneten Wert ermittelt, während Neumann[4] in ähnlichen Versuchen eine gute Übereinstimmung auf Grund der molaren Verhältnisse gefunden hatte.

III. Vergleichung kolorimetrischer und biologischer Auswertungsbefunde für verschiedene Digitoxinfraktionen.

Eine derartige vergleichende Auswertung von verschiedenen Digitoxinpräparaten konnte vielleicht ein Urteil darüber verschaffen, ob die biologische Wirksamkeit ein genügender Maßstab für die Reinheit und Einheitlichkeit eines Glykosidpräparates ist. Es standen uns einige „Reinpräparate" zur Verfügung, die wir der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Fromherz (Hoffmann-La Roche) verdanken. Daneben diente noch ein altes, im Institut vorhandenes Präparat „Digitoxin. kristallisat. Merck" als Vergleich.

[8] Stoll, A., J. Renz u. W. Kreis: Helvet. chem. Acta **20**, 1484 (1938). — [9] Lendle, L., u. H. Puhlmann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 296 (1938). [10] Straub, W.: Ebenda **80**, 52 (1917).

Die biologische Auswertung erfolgte in den Monaten November und Dezember an männlichen Grasfröschen in der üblichen Weise unter Berechnung der mittleren letalen Dosis nach der Formel von Behrens-Kärber[11]. Die Empfindlichkeit des Froschmaterials wurde jeweils durch die gleichzeitige Auswertung eines nationalen Standard-Blätterpräparates ermittelt. Alle angegebenen Werte wurden danach auf 100% Empfindlichkeit reduziert.

In der folgenden Tabelle 6 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammengestellt.

Tabelle 6.

Präparate	Farbfaktor	Abweichung vom theoretischen Faktor (32,1) %	Frosch-empfindlichkeit %	Letale Dosis reduziert mg pro g
Digitoxin 1929	27,2	— 15	124	0,0043
„ 1934	28,3	— 11,8	124	0 0044
„ 1938	29,6	— 7,8	110	0,0037
„ 1938	31,0	— 3,4	160	0,0051
Digitoxin-Merck ...	33,6	+ 4,6	160	0,0058

Diese Zahlen zeigen, daß der kolorimetrische Wert der verschiedenen Reinpräparate noch Abweichungen außerhalb der Fehlergrenze von 5% aufweisen kann, besonders die älteren Chargen lieferten einen niedrigen Farbfaktor, d. h. ihre chemische Reaktionsfähigkeit ist etwas größer als dem Digitoxingehalt entspricht. Nur das alte Digitoxinpräparat Merck ist vielleicht etwas weniger „farbwirksam". Der biologische Wirkungswert zeigt auch geringe Abweichungen, die aber durchaus innerhalb der größeren Fehlerbreite solcher Verfahren liegen. Dabei wurde auch das gleiche Präparat zu verschiedenen Zeiten bei anderer Froschempfindlichkeit geprüft. Die beiden Werte liegen etwa 20% auseinander.

Die kolorimetrische Bestimmung, welche selbst nicht allein das reine Glykosid anzeigt, liefert also schon eine zuverlässigere Beurteilungsgrundlage für den Reinheitsgrad eines Glykosidpräparates, dürfte aber für die Berechnung des Molekulargewichts von Verbindungen doch nur mit besonderer Vorsicht verwendet werden können. Übrigens fanden wir in der neueren Literatur bei Salomon und Riesser[12] noch eine Angabe darüber, daß die „analytisch reinen" Digitoxinpräparate wohl nicht immer einheitlich sind. Sie liefern auch trotz häufigen Umkristallisierens keinen konstanten Schmelzpunkt. Diese Autoren betrachten dagegen die Größe der spezifischen Drehung des in Chloroform gelösten Glykosides als besser geeignet für die Beurteilung seiner Reinheit.

Anschließend sei noch kurz das Ergebnis einer Untersuchung des von W. Karrer[13] isolierten leicht kristallisierenden Digitalisblätterglykosides

[11] Behrens, B.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **140**, 237 (1929); G. Kärber: Ebenda **162**, 480 (1931). — [12] Salomon u. Riesser: Ebenda **177**, 450 (1935). — [13] Karrer, W.: Festschr. f. E. Chr. Barell, Basel 1936, S. 238.

„Diginin" bekanntgegeben. Dieses Glykosid ist nach Angaben von Fromherz, dem wir das Präparat verdanken, am isolierten Froschherzen praktisch völlig unwirksam*. Es gibt aber nach den Angaben von Karrer eine positive Legalprobe. Wir bestätigten dies für die Baljetsche Reaktion. Es besitzt also wahrscheinlich die gleiche ungesättigte Lactongruppe. Die stufenphotometrische Auswertung ergab einen besonders hohen Farbfaktor von 13,6. Einen so hohen Wert haben wir bisher für keines der geprüften Glykoside errechnet bzw. gefunden. Die elementare Zusammensetzung des Glykosides ist noch nicht beschrieben.

IV. Zur Frage des „Titersturzes".

Von W. Straub [10] ist früher gelegentlich seiner Untersuchungen über die Aufschließung von Digitalisblättern mit verschiedenen Extraktionsverfahren nachgewiesen worden, daß die Wirksamkeit der in das Kaltwasserextrakt eingehenden „Gitalinfraktionen" beim Erwärmen und bei Einwirkung von verdünntem Alkohol einen Wirkungsverlust („Titersturz") erleidet, der mehr als 20% betragen soll. Über die chemischen Grundlagen dieser auch von anderer Seite bestätigten größeren Labilität des Gitalins scheint nichts bekannt zu sein.

Von Herrn Fromherz erhielten wir freundlicherweise auch eine wasserlösliche Glykosidfraktion (Nr. 1219) aus Digitalisblättern, für die er selbst früher einen Titersturz bis zu 50% des biologischen Wirkungswertes gefunden hatte. Wir stellten daraus eine frische Lösung mit 30%igem Alkohol her, welche sofort und nach 1—2 Monaten erneut kolorimetrisch bestimmt wurde. Im ersten Falle war der Farbfaktor 39,1 und im zweiten Falle 39,4. Es bestand also kein erkennbarer Unterschied. Eine gleichzeitige biologische Auswertung der alten und einer entsprechend neu hergestellten Lösung dieser Fraktion ergab am Frosch dagegen einen Wirkungsverlust von mehr als 30% für die alte Lösung.

Herrn Prof. Cloetta verdanken wir auch die Überlassung eines wertvollsten kleinen Restbestandes seines Gitalinpräparates. Mit diesem wurden auch einige orientierende Versuche ausgeführt. Die Prüfung erfolgte zunächst unter Bereitung einer Lösung 1 : 1000 in 96%igem Alkohol, aus der sofort eine Verdünnung mit einem Alkoholgehalt von 30% hergestellt wurde. Der hierfür gefundene Faktor ist in Tabelle 5 angegeben. Er weicht noch um etwa 30% von dem theoretisch errechneten Faktor ab. Nachdem diese Lösung wochenlang bei Zimmertemperatur gestanden hatte, lieferte sie den gleichen Farbfaktor.

Es wurden nun noch einige Versuche mit dieser kostbaren Substanz nach frischer Lösung in Wasser ausgeführt. Es zeigte sich dabei freilich, daß ihre Löslichkeit nur gering war. Die Verbindung konnte nicht 1 : 10000

* Anmerkung: 0,2 mg/g Frosch waren unwirksam. Eine Lösung 1 : 1000 löste am isolierten Froschherzen nur eine diastolische Wirkung aus (Versuchsprotokoll Prof. Fromherz).

voll gelöst werden trotz längeren Schüttelns auf der Maschine. Die klar filtrierte Lösung gab daher auch einen relativ hohen Farbfaktor von 45,3, und die biologische Auswertung dieser Lösung, welche wegen der geringen Konzentration nur mit großen Flüssigkeitsmengen und entsprechend großer Streuung vorgenommen werden konnte, ergab eine mittlere tödliche Dosis von mehr als 0,015 mg/kg. Wenn diese absoluten Zahlenwerte auch nicht richtig sind, weil ja weniger gelöst war, als bei der Dosierungsberechnung zugrunde gelegt worden ist, so interessierte doch die Frage, ob bei Erhitzung dieser Lösung (60 Min. im Wasserbad) eine Änderung des kolorimetrisch ermittelten Farbfaktors auftritt. Die Bestimmung dieses Wertes ergab nach Erwärmen eine gleiche Größe, und die biologische Wirksamkeit der Lösung zeigte auch keine Änderung.

Aus diesen Befunden kann die Folgerung gezogen werden, daß beim Stehen einer alkoholischen Lösung einer Gitalinfraktion ein Titersturz für die biologische Wirkung eintritt ohne gleichzeitige Änderung des Farbfaktors, und daß das reinste Gitalinpräparat (Cloetta) weder eine biologische noch eine kolorimetrische Wertänderung erlitt beim Erwärmen der wässerigen Lösung. Diese Feststellung läßt daran denken, daß der Titersturz vielleicht gebunden ist an Veränderungen an einer genuinen Glykosidstufe in den Blätterextrakten und nicht an eine Beeinflussung der spezifischen ungesättigten Lactongruppe. Dafür spricht übrigens auch die folgende Überlegung: Es ist bekannt, daß dieser Titersturz nur einen Grenzwert erreicht, was niemals möglich wäre, wenn die Wirkung die spezifische Gruppe beträfe, weil dann die zu erreichende Grenzwirkung gleich Null wäre, und nicht einzusehen wäre, warum der Prozeß nicht allmählich alle vorhandenen Moleküle erfassen sollte. Wenn aber z. B. eine Glucoseabsprengung eine partielle Wirkungsabschwächung bedingt, dann könnte ein entsprechender stabiler Grenzwert erreicht werden.

Wir haben, weil uns diese Frage wichtig erschien, noch eine Versuchsreihe mit einem alten, im Institut reichlich vorhandenen Gitalinpräparat (Boehringer) ausgeführt. Es wurde eine frische Lösung 1 : 4000 mit 30%igem Alkohol hergestellt, deren Farbfaktor mit 48,75 noch höher gelegen ist als der des Cloettaschen Reinpräparates. Auch dieses Präparat löste sich nicht ausreichend in wässeriger Lösung. Eine filtrierte wässerige Lösung lieferte sogar nur einen Farbfaktor von 91,3 und nach 60 Minuten Erhitzen im Wasserbad von 90,5. Es war also wiederum keine kolorimetrische Änderung zu erkennen.

Von dem gleichen Präparat wurde ferner eine wässerige Lösung in starker Verdünnung 1 : 50000 angesetzt, so daß mit einer genügenden Löslichkeit gerechnet werden konnte. In diesem Falle war auch jeder etwaige Titersturz bei kurzfristiger Alkoholeinwirkung wie bei der Herstellung der früheren Lösungen auszuschließen. Der für diese wässerigen Lösungen gefundene Farbfaktor betrug 54,8. Der Wert lag also nicht weit entfernt von

dem mit der alkoholischen Lösung vorher gefundenen Wert von 48,9. Er lag auf keinen Fall niedriger, so daß also ein Alkoholtitersturz unwahrscheinlich ist.

In einer brieflichen Stellungnahme zu unseren Ergebnissen wies Herr Prof. Fromherz uns freundlicherweise darauf hin, daß der „Titersturz" nur in verdünnten alkoholischen Lösungen erfolgt, nicht z. B. in absolut alkoholischen Extrakten aus der Droge. Der dem Titersturz vermutlich zugrunde liegende Abbau höher molekularer, genuiner Glykosidstufen scheine also durch hydrolytische Vorgänge bedingt zu sein. Die sogenannten „Reinpräparate" von Gitalin können, da sie schon wahrscheinlich ihren Titersturz infolge der eingreifenden Maßnahmen bei der Darstellung hinter sich haben, keine Wirkungseinbuße mehr erleiden.

Zusammenfassung.

Die Baljetsche Reaktion der Digitalisglykoside mit alkalischer Pikrinsäure, welche schon von verschiedenen Autoren für den spezifischen quantitativen Nachweis von Reinglykosiden verwendet worden ist, wurde für die stufenphotometrische Bestimmung verschiedener Glykosid- und Geninpräparate herangezogen.

Dabei wurden die ermittelten Werte der „Farbfaktoren" mit denen verglichen, die für den betreffenden Stoff errechnet werden konnten, auf Grund seines Molekulargewichtes und des dementsprechenden Anteils der ungesättigten Lactongruppe. Es ergab sich dabei, daß eine Anzahl Glykoside eine auf 5% befriedigende Übereinstimmung lieferten, besonders einige der neuen in schonender Weise gewonnenen „genuinen" Glykoside (Purpureaglykosid A, Digilanid A, k-Strophanthosid), aber auch Gitoxin, Digitoxin, k-Strophanthin, Cymarin, g-Strophanthin und Convallatoxin.

Die Bedeutung zu hoher und zu niedriger Farbfaktoren wird erörtert.

Vergleichende Bestimmungen verschiedener Digitoxinchargen ergab bei guter Übereinstimmung der biologischen Wirksamkeit doch noch geringe Abweichungen der Farbfaktoren, so daß vielleicht gewisse Ungleichmäßigkeiten in der Zusammensetzung der Präparate möglich sind. Ein von Karrer neuerdings dargestelltes Blätterglykosid Diginin, welches biologisch kaum wirksam ist, lieferte den kleinsten Farbfaktor, also die höchste Farbaktivität.

Die Frage des „Titersturzes" von Gitalinpräparaten wurde mit dem gleichen Verfahren geprüft. Reinpräparate von Gitalin zeigten keine Veränderung des Farbfaktors nach Erhitzen und Alkoholbehandlung. Dabei scheint allerdings auch die biologische Wirksamkeit nicht vermindert zu werden. Dagegen zeigte eine wasserlösliche Fraktion aus Digitalisblättern eine Abnahme der Wirksamkeit ohne Veränderung des Farbfaktors. Es scheint danach möglich, daß der sogenannte Titersturz nicht an die spezifische Lactongruppe des Moleküls gebunden ist und vielleicht nur bei genuinen Glykosidfraktionen auftritt.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster i. Westf. (Direktor: Prof. L. Lendle.)

Über die Bindung von Digitalisglykosiden und Digitaloiden an die Eiweißstoffe des Blutserums.

Von

W. Haarmann, A. Hagemeier und L. Lendle.

(Eingegangen am 10. November 1939.)

Die Bindungsbedingungen der Digitalisglykoside an die Herzmuskulatur oder andere Organgewebe sind vielfach quantitativ geprüft worden. Dabei wurde neben einer ersten adsorptiven Anreicherung auf Grund der Oberflächenaktivität der den Saponinen nahestehenden Stoffe (W. Straub[1]) eine folgende Fixierung durch chemische Reaktionen angenommen. Fischer[2], Heyden[3] u. a. haben diese Ansichten auch experimentell genauer begründet. An welchen chemischen Bestandteilen des Gewebes diese chemischen Reaktionen sich abspielen, konnte jedoch noch nicht klargestellt werden.

Eine ältere Erfahrung von Oppenheimer[4] über eine Entgiftung des Digitoxins durch Serumzusatz bei der Einwirkung am isolierten Froschherzen wurde neuerdings von R. H. Hoekstra[5, 6] weiter ausgebaut. Es gelang ihm, in mehreren Arbeiten nachzuweisen, daß die Serumeiweißkörper Träger dieser Entgiftung sind und daß die einzelnen Digitalisglykoside und Digitaloide sich diesen Stoffen gegenüber verschieden verhalten. Strophanthin soll nicht gebunden werden, während Digitoxin weitgehend gebunden wird. Hoekstra[7] hat auch daran anschließend die Frage erörtert, ob dadurch eine Hemmung für die Aufnahme der Giftstoffe in die Herzmuskelzelle gegeben sei. Nach seinen Feststellungen vermag nur artfremdes Eiweiß diese Entgiftung des Digitoxins auszuüben, weil der Komplex des arteigenen Eiweiß mit den Digitalisglykosiden die Zellmembran passiert und somit wirksam wird. Bei diesen Untersuchungen wurden auch einige weitere interessante oder merkwürdige Teilbeobachtungen beschrieben, wie z. B. die Tatsachen, daß durch Inaktivierung des Serums mittels Erwärmen auf 60° dieses seine Bindungsfähigkeit verliert, sie aber bei Zusatz weniger Tropfen wieder gewinnen kann. Denaturiertes Eiweiß besitzt keine Bindungsfähigkeit mehr. Durch Zusatz von Saponin soll die reversible Bindung wieder aufgehoben werden können.

[1] Straub, W.: in Fraenkel, Der Weg zur ration. Therapie. Leipzig 1933, S. 46. — [2] Fischer, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **130**, 111 (1928). — [3] Heyden: Ebenda **164**, 293 (1928). — [4] Oppenheimer, E.: Biochem. Z. **55**, 134 (1913). [5] Hoekstra, R. A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **162**, 649 (1931). — [6] Hoekstra, R. A.: Ebenda **163**, 1 (1932). — [7] Hoekstra, R. A.: Ebenda **162**, 663 (1931).

Einige dieser Beobachtungen konnten schon von Lendle und Pusch[8] wie von Genuit und Eschbach[9] bestätigt werden, so insbesondere die Feststellung, daß für Digitoxin und Strophanthin ein quantitativer Unterschied der Bindungsfähigkeit besteht. Die Entgiftung durch artfremdes Eiweiß scheint übrigens keine absolute zu sein, sondern stellte sich am isolierten Warmblüterherzen nur als eine zeitliche Verzögerung der Wirkung dar. Dies deutet darauf hin, daß der Glykosideiweißkomplex doch vielleicht vor der Aufnahme in der Zelle gespalten wird oder daß das Glykosid vom Eiweißkomplex an andere Eiweißmoleküle weiter gereicht werden kann, wie das z. B. bei Schwermetallkomplexbindungen neuerdings angenommen wird (W. Heubner[10]).

Im Anschluß an die bisherigen Erfahrungen waren noch einige wichtige Verhältnisse zu klären, welche die Frage des Bindungscharakters selbst betreffen (adsorptive oder chemische Bindung, Bindung an Albumine oder Globuline, Reversibilität, Abhängigkeit von bestimmten Faktoren des Milieus). Die Aufnahme solcher Untersuchungen unter Vergleichung des Verhaltens verschiedener Glykoside konnte vielleicht auch näher an die Hauptfrage nach dem Substrat der Bindung im Herzmuskel selbst heranführen. Ferner mußte es von Interesse sein, diese Bindung auch unter dem Gesichtspunkt zu betrachten, daß die Digitalisstoffe zu der großen Gruppe der biologisch hochaktiven Steroide gehören.

In einigen vorausgegangenen Arbeiten (Lendle und Schmelzer[11], Lendle und Pusch[8], Hauschild[12] sowie Hagemeier[13]) ist die Baljetsche Farbreaktion der Digitalisverbindungen für ihren quantitativen Nachweis ausgearbeitet und schon bei in vitro-Versuchen über die Bindungsbedingungen der Glykoside verwendet worden. Diese hochempfindliche Reaktion gestattet bei Verwendung von Reinglykosiden deren Konzentrationen schnell und zuverlässig kolorimetrisch zu erfassen, wobei die Fehlergrenze wesentlich geringer ist als bei biologischen Nachweisreaktionen.

Es konnte daher der Versuch unternommen werden, auch die Bedingungen für die Bindung der Digitalisstoffe an Eiweiß in vitro zu studieren. Voraussetzung war dabei, daß der nicht gebundene Anteil der Digitalisstoffe ohne Störung der Bindung des restlichen Anteils von den Eiweißkörpern abgetrennt werden kann. Frühere Fällungsversuche von Hoekstra[6] mit Aluminiumhydroxyd und Serum haben keine genügende Beweiskraft, weil dabei das Aluminiumhydroxyd selbst oder der ausgeflockte Niederschlag auch Glykosid binden können. Wir haben daher früher schon mit Hilfe der Ultrafiltration den Nachweis einer Bindung erbracht[8]. Damals war aber der Nachweis noch mit biologischer Testmethode aus-

[8] Lendle, L., u. Fr. Pusch: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **177**, 551 (1935). — [9] Genuit u. W. Eschbach: Ebenda Arch. **188**, 302 (1938). — [10] Heubner, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1933, S. 1254. — [11] Lendle, L., u. W. Schmelzer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **177**, 622 (1935). — [12] Hauschild, Fr.: Ebenda **179**, 255 (1935). — [13] Hagemeier, A.: Ebenda **194**, 195 (1939).

geführt worden, weil das Serum noch erhebliche Mengen von Stoffen ins Ultrafiltrat abgibt, welche auch die der Baljetschen Probe zugrunde liegende Jaffe-Reaktion geben.

In unseren neuen Versuchen mit reinen Eiweißfraktionen waren solche Fehler zwar auszuschließen, aber in früheren Versuchen war es trotzdem nicht gelungen, bei solchen Ultrafiltrationen von gereinigten Eiweißstoffen ein „Leerwert"-freies Filtrat zu gewinnen. Es scheint bei derartigen Versuchen je nach der verwendeten Art von Gummidichtungsringen ein solcher Stoff in wechselnden Mengen in Lösung zu gehen, der selbst einen hohen Leerwert liefert, welcher die Bestimmung niedriger Glykosidkonzentrationen beeinträchtigt. Außerdem ist die Ultrafiltrationsmethode wegen der zeitlichen Dauer der Versuche für Serienansätze auch nicht geeignet*. Auf freundliche Beratung von Herrn Prof. Dr. H. H. Weber bedienten wir uns daher des Verfahrens der Ausgleichdialyse, welches gestattete, zahlreiche Versuche unter wechselnden Bedingungen nebeneinander auszuführen.

I. Methodik.

Für die Gewinnung der verschiedenen Serumeiweißfraktionen, welche aus dem Blute von Mensch, Pferd und Kaninchen dargestellt wurden, diente das folgende Verfahren:

Durch 5tägige Dialyse des Serums in Cellophanschläuchen gegen häufig gewechseltes destilliertes Wasser wird zunächst die Hauptmenge der Euglobuline zur Ausscheidung gebracht. Der Rest der Euglobuline wird nach Abtrennung der ausgefallenen Euglobuline durch Abzentrifugieren durch Elektrodialyse im Paulischen[15] Elektrodialysierapparat entfernt. Als Elektroden werden Platindrahtnetzelektroden verwendet. Als Membranmaterial bewährte sich Cellophan. Das anfangs nach Ettisch[16] als negative Membran an der Anodenseite verwendete Pergamentpapier und als positive Membran an der Kathodenseite verwendete Eialbumin-Kollodium zeigte keine wesentlichen Vorteile. Die Elektroden werden direkt ohne Zwischenschaltung von Widerständen an das Starkstromnetz angeschlossen. Durch Veränderung des Elektrodenabstandes von der Cellophanmembran in den Außenkammern läßt sich die Stromstärke bequem regulieren. Zum Schluß sind die Elektroden etwa 3 mm von den Cellophanmembranen entfernt. Die Eiweißlösung in der 60 ccm fassenden Mittelkammer wird durch einen schraubenförmig gewundenen Glasrührer mittels Elektromotors ständig durchmischt. Die Temperatur in der Mittelkammer darf 30° nicht übersteigen. Die Außenkammern werden mit eisgekühltem destilliertem Wasser durchspült. Die Elektrodialyse wird beim Erreichen des isoelektrischen Punktes der Globuline ($p_H = 5{,}4$) abgebrochen. Dieser Punkt ist dann erreicht, wenn eine aus der Mittelkammer entnommene Probe mit Methylrot plus Methylenblau (0,1% Methylrot + 0,05% Methylenblau in Alkohol), die sich anfangs grün färbt, eine schmutzig blaue Farbe annimmt**. Violettfärbung zeigt

* Anmerkung: Bennhold[14] hat auch darauf hingewiesen, daß bei der Ultrafiltration der hohe Druck den Hydratationsgrad des Eiweiß und seinen „nichtlösenden Raum" ändern kann.

** Vergleiche die Verwendung dieses Mischindikators bei W. Haarmann[17].

[14] Bennhold: Erg. inn. Med. **42**, 273 (1932). [15] Pauli, W.: Biochem. Z. **144**, 278 (1924). — [16] Ettisch u. Ewig: Ebenda **195**, 175 (1928); **200**, 250 (1928). — [17] Haarmann, W.: Ebenda **296**, 121 (1938).

bereits eine zu starke Säuerung an. In letzterem Falle wird der Inhalt der Mittelkammer mit verdünnter Ammoniaklösung versetzt, bis eine Probe mit der Indikatorlösung eine Grünfärbung ergibt, worauf bis zum Erreichen des Umschlagpunktes des Indikators weiter dialysiert wird. Die vereinigten Euglobuline werden zweimal mit dest. Wasser gewaschen und durch verdünnte Sodalösung bis zum Erreichen des Neutralpunktes in Lösung gebracht. Der Eiweißgehalt der Lösung, wie überhaupt aller Eiweißlösungen wurde aus dem nach Kjeldahl-Veraschung ermittelten N-Gehalt berechnet. Die Bestimmung des Ammoniaks geschah dabei in der Versuchsanordnung von Haarmann[17].

Das euglobinfreie Serum wird nach Verdünnung mit der doppelten Menge dest. Wassers mit der gleichen Menge gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, das ausgefallene Pseudoglobulin nach Stehen über Nacht abfiltriert, wieder in dest. Wasser gelöst und in gleicher Weise erneut mit Ammonsulfat niedergeschlagen. Das in wenig Wasser gelöste Pseudoglobulin wird durch Dialyse und anschließende Elektrodialyse von den Salzen befreit. Im Filtrat der Ammonsulfatfällung werden die Albumine durch Zusatz von 0,5% Essigsäure abgeschieden, in dest. Wasser unter Zusatz von verdünnter Sodalösung bis zum Erreichen des Neutralpunktes in Lösung gebracht und durch Dialyse und Elektrodialyse weiter gereinigt.

Alle Eiweißlösungen erhielten einen Zusatz von 0,9% Natriumchlorid.

Die Bindungsgröße der Glykoside an den verschiedenen Eiweißfraktionen wurde nach dem Prinzip der „Austauschdialyse" in einer Versuchsanordnung vorgenommen, die sich an die eingehende Beschreibung von Rona und Michaelis[18] anschließt:

Als Dialysiermembran zur Bestimmung des freien, nicht an Eiweiß gebundenen Anteils der diffusionsfähigen Glykoside und Genine dienten die sehr haltbaren Diffusionshüllen von Schleicher und Schüll, Nr. 579, Durchmesser 16 mm, Höhe 100 mm (Innenmaße). Die Austauschdialyse geht in diesen Pergamentschläuchen mit verhältnismäßig großer Oberfläche bei kleiner Flüssigkeitsmenge schnell vonstatten. Zur Vermeidung von Bakterienwachstum wird im Eisschrank bis zum Gleichgewicht dialysiert, was nach 1 Tag noch nicht vollkommen, wohl aber nach 3 Tagen erreicht ist. Die Hülsen werden innen mit 7,0 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit (Serum, Serumeiweißstoffe) und außen mit 7,0 ccm der verwendeten Außenflüssigkeit gefüllt. Hierbei werden die Hülsen derart in den Glasröhrchen mit rundem Boden befestigt, daß die Flüssigkeitsspiegel außen und innen von gleicher Höhe sind. Zur Vermeidung von Flüssigkeitsströmungen müssen Außen- und Innenflüssigkeit stets isotonisch sein.

Als Beispiel sei die Zusammensetzung eines Versuchs angegeben. Innenflüssigkeit: 5,60 ccm einer 1,25%igen Albuminlösung in 0,9%igem Natriumchlorid + 1,40 ccm Digitoxin $^1/_{10000}$ in 30%igem Alkohol; Außenflüssigkeit: 5,60 ccm 0,9%ige Natriumchloridlösung + 1,4 ccm Digitoxin $^1/_{10000}$ in 30%igem Alkohol. Die Endkonzentration der Albuminlösung in der Innenflüssigkeit beträgt mithin 1,00% bei einer Digitoxinkonzentration von $^1/_{50000}$ und einer Alkoholkonzentration von 6% in der Außen- und Innenflüssigkeit. Da die Eiweißlösungen zum Teil geringe Mengen von Substanzen abgeben, die mit alkalischer Pikrinsäure eine Färbung geben, müssen zu allen Versuchen, die stets doppelt angesetzt werden, die entsprechenden Kontrollversuche ohne Glykosidzusatz angesetzt werden. Sie enthalten als Zusatz an Stelle der Glykosidlösungen eine Lösung von 30%igem Alkohol.

Der Gleichgewichtszustand ist dann erreicht, wenn die Menge der freien, nicht an Eiweiß gebundenen Glykoside außen und innen gleich ist. Wird Glykosid von Eiweiß gebunden, so sinkt die Menge des freien Glykosides in der Innenflüssigkeit. Es strömt nunmehr Glykosid von der Außenflüssigkeit durch die Membran in die

[18] Michaelis u. Rona: Biochem. Z. **14**, 476 (1908); Praktik. der Physikal. Chemie. Berlin 1930, S. 95.

Innenflüssigkeit, bis der freie Anteil außen und innen gleich ist. Bei vollständiger Bindung der Glykoside ist die Außenflüssigkeit glykosidfrei. Die gebundene Glykosidkonzentration ergibt sich aus der Differenz der vorgelegten Glykosidkonzentration und der wiedergefundenen Glykosidkonzentration. Da die Konzentration an freiem Glykosid außen und innen gleich ist, errechnet sich mithin die gebundene Glykosidmenge als Produkt aus der gesamten Flüssigkeitsmenge (innen und außen) und der Differenz aus vorgelegter Glykosidkonzentration und wiedergefundener Glykosidkonzentration in der Außenflüssigkeit. In den späteren Tabellen ist nur die einfache Differenz in mg% angegeben.

Die Hülsen sind nach häufigem Ausspülen mit dest. Wasser und Wässern in dest. Wasser erneut verwendungsfähig.

II. Bindung an Albumin und Globuline des Serums.

Nach den früheren Erfahrungen von Hoekstra, Lendle und Pusch u. a. wird Digitoxin, aber nicht das Strophanthin an das Serumeiweiß gebunden. Es wurde daher auch auf eine Prüfung der Strophanthinbindung an die Globuline verzichtet, als sich herausstellte, daß die beiden Globulinfraktionen des Serums in 1%iger Lösung das Digitoxin und verwandte Glykoside nicht in erkennbarer Menge zu binden vermögen (vgl. Tabelle 1 und 2). Diese negativen Ergebnisse beweisen übrigens gleichzeitig die Zuverlässigkeit der kolorimetrischen Methode bei diesen Versuchsansätzen, da die zugefügten Konzentrationen mit ± 3% Fehler wiedergefunden wurden.

Tabelle 1. Eu-Globulin, 1% (Kaninchen).

Zusatz	mg%	*E* red.	Freie mg%	Gebundene mg%
Digitoxin	1,0	0,0335	0,99	—
Digitoxin Merck	1,0	0,0295	0,99	—
Digilanid A	1,0	0,0287	1,02	—
Digilanid B	1,0	0,0200	1,04	—
Purpureaglykosid	1,0	0,0260	1,00	—
Oleandrin	1,0	0,0295	1,03	—
Convallatoxin	1,0	0,0385	1,02	

Tabelle 2. Pseudo-Globulin, 1% (Kaninchen).

Zusatz	mg%	*E* red.	Freie mg%	Gebundene mg%
Digitoxin	1,0	0,0350	1,03	
Digitoxin Merck	1,0	0,0305	1,01	—
Digilanid A	1,0	0,0285	1,01	—
Digilanid B	1,0	0,0195	1,02	—
Digilanid C	1,0	0,0210	1,03	—
Purpureaglykosid	1,0	0,0255	0,98	—
Oleandrin	1,0	0,0265	0,95	
Convallatoxin	1,0	0,0365	0,97	

Die Bindungsversuche mit Serumalbumin sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Auch hier wurden 1%ige Endlösungen verwendet und gleichzeitig die Glykoside in 1 und 2 mg%iger Lösung geprüft. Es zeigten sich

Tabelle 3. Albumin, 1% (Kaninchen).
(Alkoholkonzentration 3 bzw. 6%.)

Zusatz	Vorgelegt 1 mg% gebunden (mg%)	Vorgelegt 2 mg% gebunden (mg%)	Zusatz	Vorgelegt 1 mg% gebunden (mg%)	Vorgelegt 2 mg% gebunden (mg%)
Digitoxin	0,616 0,585	1,068 1,023	g-Strophanthin	0,415 0,352	0,280 0,280
PurpureaglykosidA	0,465 0,484	1,005 0,985	k-Strophanthin	0,392 0,344	0,464 0,464
Digilanid A	0,622 0,567	0,897 0,915	Cymarin	0,158 0,241	0,389 0,324
Digilanid B	0,732 0,711	0,863 0,787	k-Strophanthosid	0,060 0,002	0,070 0,070
Digilanid C	0,128 0,026	0,203 0,203	Convallatoxin	0,401 0,367	0,407 0,373
Digitalin	0,307 0,293	0,651 0,679	Adonidosid	0,455 0,465	0,480 0,480
Oleandrin	0,965 0,895	0,990 1,018	Adonivernosid	0,322 0,272	0,507 0,544

dabei einige Unterschiede für die einzelnen Stoffe. Zunächst ergab sich dabei, daß praktisch alle geprüften Verbindungen, mit Ausnahme des Strophanthosids, an die Albumine gebunden werden. Die Bindung für die Stoffe der Digitalisreihe ist dabei größer (60% und mehr) als die der Strophanthinreihe (20—40%). Es besteht also nur ein quantitativer Unterschied für Digitoxin und Strophanthin. Als besondere Unterschiede, die wenigstens für die unteren Glykosidkonzentrationen in Erscheinung treten, mögen noch folgende Befunde herausgehoben werden: Digilanid C wird kaum gebunden, während Digilanid A und B gut gebunden werden, B vielleicht eher mehr als A. Das genuine Purpureaglykosid A wird weniger gebunden (47%) als das Digitoxin (60%). Besonders groß ist die Bindungsfähigkeit für das Oleandrin (etwa 90%). Die beiden Adonisglykoside, Convallatoxin und Digitalin werden nur mäßig gebunden (20—40%). In der Strophanthinreihe bestehen zwischen der Bindung des g- und des k-Strophanthins keine wesentlichen Unterschiede (etwa 40%). Das Cymarin wird etwas weniger gebunden (20%) und das k-Strophanthosid merkwürdigerweise gar nicht. Diese letzte Feststellung ist schwer zu verstehen, weil nach der heute durch die Untersuchungen von Stoll und Mitarbeitern[19] bekannte Struktur dieser Verbindungen wohl kein Anlaß für diese Unterschiede besteht. Die höhere Wasserlöslichkeit gegenüber dem Cymarin kann wohl nicht die Ursache sein, um so weniger, als das k-Strophanthin selbst zum größten Teil aus Strophanthosid besteht.

Die Ergebnisse zeigen also bei genauer quantitativer Prüfung der Bindungsbedingungen im allgemeinen nur gradweise Unterschiede der Bindungsfähigkeit an die Albumine. Es konnten also die Angaben von

[19] Stoll, A., J. Renzu u. W. Kreis: Helvet. chem. Acta **20**, 1484 (1938).

Hoekstra[5] nicht bestätigt werden, nach welchen Strophanthin im Gegensatz zum Digitoxin gar nicht gebunden werde. Diese Einschränkung gilt übrigens wohl auch für die verschiedenen Glykosidfraktionen aus Digitalisblättern, für welche Hoekstra[7] gleichfalls solche absolute Unterschiede angenommen hatte und die er mittels Eiweißzusatz und anschließende Fällung bei der Aufschließung der Droge zu trennen versuchte. Auf die Unzuverlässigkeit dieses Verfahrens ist übrigens schon von Fromherz, Karrer u. a.[20] hingewiesen worden. Wir konnten für eine wasserlösliche Digitalisfraktion Nr. 1219 gleichfalls eine Bindungsfähigkeit nachweisen (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4. Bindung an 0,8% Albumin (Person M.).

	Vorgelegt 1 mg%, gebunden mg %	Vorgelegt 2 mg%, gebunden mg%		Vorgelegt 1 mg%, gebunden mg%	Vorgelegt 2 mg%, gebunden mg%
Digitoxin Nr. 1219	0,42	0,59	Digitoxin Nr. 1219	0,36	0,71
	0,37	0,62		0,40	0,71

Einige Bindungsversuche wurden auch mit Hämoglobin ausgeführt, welches in die Gruppe der Albumine eingereiht wird. Dieser Eiweißkörper vermochte aber ebensowenig wie das Globulin des Serums das Digitoxin zu binden (Tabelle 5).

Tabelle 5. Hämoglobin, 1%.

Zusatz	Gebunden mg%	Zusatz	Gebunden mg%
Digitoxin (1 mg%)	0,024	Digitoxin (2 mg%)	0,110
	0,008		0,110

In Ergänzung dieser ersten Ergebnisse seien noch einige Angaben über einige Kontrollversuche über den Einfluß des Alkohols auf diese Vorgänge angeführt. Bei den Versuchen mit höheren Glykosidkonzentrationen waren nämlich wegen deren schlechter Löslichkeit Alkoholbeimischungen bis 3 bzw. 6% benötigt worden. Wir verwendeten für diese Kontrollversuche g-Strophanthin in Konzentrationen von 2 mg%, von dem wegen seiner Wasser- und Alkohollöslichkeit eher eine Beeinflussung seiner Bindungsneigung zu erwarten war und für welches in Tabelle 3 gerade die merkwürdige Feststellung gemacht worden war, daß aus der höheren, alkoholreicheren Konzentration auch absolut weniger an das Eiweiß gebunden wird als aus der schwächeren Konzentration.

Tabelle 6 bringt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Es zeigte sich tatsächlich eine Abschwächung der Bindungsfähigkeit an das Albumin

[20] Fromherz, Karrer u. Guggenheim: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **165**, 412 (1932).

Tabelle 6. Bindungen von g-Strophanthin an Albumin bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen.

Zusatz	Alkoholkonzentration %	Gebunden mg%
g-Strophanthin 2 mg%	0	0,244
		0,223
	1	0,161
		0,183
	2	0,183
		0,137
	4	0,115
		0,106
	8	0,054
		0,075

mit steigender Alkoholbeimischung. Die Bindungswerte sanken von 20% auf 6%. Diese Feststellung war die Veranlassung, alle Versuche mit den verschiedenen Glykosiden, auch den wasserlöslichen, mit gleichen Alkoholkonzentrationen auszuführen.

Dieses Ergebnis dürfte wohl auch den vorher erwähnten Befund erklären, daß von dem g-Strophanthin aus der alkoholreicheren, höheren Glykosidkonzentration sogar weniger gebunden werden konnte. Auch für das gut wasserlösliche k-Strophanthosid wäre vielleicht an eine solche Ursache zu denken.

In weiteren Versuchen wurde die Bindungsfähigkeit des Albumins aus verschiedenen Seren geprüft und außerdem auch das Verhalten verschiedener Digitoxinfraktionen, da in den früheren Versuchen von Hagemeier[13] gezeigt worden war, daß da noch gewisse Unterschiede bestehen mögen. Die gleichen dort verwendeten Chargen wurden auch hier geprüft. Gleichzeitig wurde dabei auch das Digitoxigenin und ein biologisch unwirksames Glykosid der Digitalisblätter, das Diginin, welches aber die spezifische Farbreaktion liefert, herangezogen.

In Tabelle 7 sind die Befunde mit den verschiedenen Digitoxinen aufgenommen. Als Ergebnis kann danach festgestellt werden, daß die 3 Proben ziemlich gleichmäßig gebunden werden. Auch das Digitoxigenin wird an das Albumin gebunden. Die Bindungsgröße ist dabei kaum geringer als die des Digitoxins, in der höheren Konzentration eher sogar stärker.

Das Diginin, über welches in der vorausgehenden Arbeit von Hagemeier[13] schon berichtet worden ist, wird gleichfalls, wenn auch etwas weniger gebunden. Seine fehlende biologische Wirksamkeit kann daher nicht auf der mangelnden Bindungsfähigkeit an Eiweiß beruhen, falls diese überhaupt eine Voraussetzung der Wirkung ist.

Nach den in Tabelle 8 zusammengestellten Erfahrungen mit verschiedenen Serumalbuminen kann gesagt werden, daß wohl kaum wesentliche Unterschiede für die Bindungsgröße bestehen. Die geringere Bindung

Tabelle 7. Bindung verschiedener Digitoxine an Albumin, 0,8% (Mehring).

Zusatz	Vorgelegt 1 mg%, gebunden in mg%	Vorgelegt 2 mg%, gebunden in mg%
Digitoxin 1938	0,42	0,59
	0,37	0,62
„ 1934	0,47	0,86
	0,46	0,86
„ 1924	0,37	0,61
	0,34	0,67
Digitoxigenin	0,36	0,90
	0,36	0,89
Diginin	0,30	0,48
	0,31	0,54

Tabelle 8. Digitoxinbindung an verschiedene Albumine.

	Aus 1 mg%	Aus 2 mg%
Albumin vom Kaninchen 1,0 %	60 %	50 %
„ von Person M. 0,8 %	40 %	30 %
„ „ „ G. 1,0 %	52 %	49 %

in dem zweiten Versuch beruht sicher darauf, daß dabei nur eine geringere Albuminkonzentration gewählt worden war (0,8% statt 1%).

Bedeutung der Glykosidbindung an die Serumeiweißkörper.

In den vorausgehenden Abschnitten ist nachgewiesen worden, daß verschiedene Digitalisglykoside in verschiedenem Ausmaß an das Serumalbumin gebunden werden, während die anderen Eiweißstoffe anscheinend kein nennenswertes Bindungsvermögen besitzen. Über die Bedeutung dieser Bindungsmöglichkeit mögen einige rechnerische Überlegungen Auskunft geben.

Zunächst kann die Frage erhoben werden, ob das Bindungsvermögen des Serums nur dem Bindungsvermögen seines Albumingehalts entspricht. Für einige Albuminarten, die wir aus verschiedenen Seren in üblicher Weise rein gewonnen hatten, ist in Tabelle 8 ein ziemlich gleichartiges Verhalten gefunden worden. Für das Kaninchenalbumin war es nur wenig größer als für Albumin aus menschlichem Serum.

Aus der wiedergefundenen Digitoxinkonzentration läßt sich in diesen Versuchen die gebundene Digitoxinkonzentration und damit die gebundene Digitoxinmenge pro vorhandene Eiweißmenge errechnen. Wenn z. B. in der Hülse 5,0 ccm 1%ige Albuminlösung vorhanden war und diesen sowohl wie den 5 ccm Außenflüssigkeit je 1 mg% Digitoxin zugesetzt wurde, und wenn nach der Austauschbindung in der Außenflüssigkeit noch 0,5 mg% gefunden wurden, so muß im ganzen Ansatz 0,5 mg% durch die Bindung

an die 50 mg Albumin verschwunden sein. Nach diesem Berechnungsverfahren würde sich in unserem Versuch ergeben, daß bei Ansetzen von 1 mg% Digitoxin pro 1 mg Albumin 1 γ und bei Zusatz von 2 mg% 2 γ pro 1 mg Albumin gebunden wurden.

In gleicher Weise wurden auch die Bindungsverhältnisse für einige Serumversuche mit Zusatz von 2 mg% Digitoxin ausgerechnet. Dabei ergaben sich die in Tabelle 9 angegebenen Werte. Es zeigte sich dabei also, daß bei menschlichen Seren die Bindungsgröße fast doppelt so groß ist, als ihrem Albumingehalt entspricht, und bei Tierseren sogar 3—4fach so groß. Es mag sein, daß im Serum also noch zusätzlich Stoffe enthalten sind, welche die Bindungsfähigkeit steigern. Darüber werden die Ergebnisse besonderer Untersuchungen in einer folgenden Arbeit von Haarmann, Korfmacher und Lendle[21] noch Auskunft geben. Es mag aber auch sein, daß durch die verschiedenen Fällungsmaßnahmen das Albumin seine hohe Bindungsfähigkeit zum Teil eingebüßt hat, wofür auch gewisse, später zu erörternde Erfahrungen über „Alterungsprozesse" am Serum sprechen.

Tabelle 9. Digitoxinbindung an Serumeiweiß.
(2 mg% Digitoxin vorgelegt.)

Serumart	Albuminkonzentration nach Verdünnung	Gebundene Konzentration mg%	Berechnete Menge pro 1 mg Albumin
Person P.	0,92	1,51	3,30
Person G.	0,53	0,95	3,60
Kaninchen	0,47	1,33	5,66
Pferd	0,24	0,88	9,0

Die rechnerische Betrachtung der Bindungsbedingungen läßt sich auch nach einer anderen Richtung weiter verwerten. Wenn 1 γ pro 1 mg oder 1 mg pro 1 g Albumin gebunden wird, so bedeutet das in molare Verhältnisse umgerechnet etwa eine Bindung von 10 Molekülen Digitoxin pro 1 Molekül Albumin. Mit dieser Bindungsgröße ist das Vermögen aber noch nicht erschöpft. Es sind in der Tabelle 9 schon Werte angegeben, nach denen das Neunfache gebunden worden ist. Das würde also bedeuten, daß die chemischen Reaktionen mit dem Eiweiß in den Konzentrationen, bei welchen Digitalisglykoside bei therapeutischer Dosierung im Blute vorkommen (etwa 1 : 50000000) nur zu einem Bruchteil die mögliche Sättigung erreicht wird.

Das bedeutet andererseits auch, daß die gesamte Glykosidmenge, welche bei der Zufuhr therapeutischer Dosen auf dem Blutwege weiter transportiert wird, im Blute an das Eiweiß gebunden sein muß. Es besteht damit also eine Parallele zu den Erfahrungen von Bennhold[14], daß die Bluteiweißkörper eine Vehikelfunktion besitzen und viele Wirkstoffe und

[21] Haarmann, W., K. Korfmacher u. L. Lendle: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 229 (1939).

körpereigene Substanzen wie Farbstoffe, Antikörper usw. gebunden halten. Die Arbeiten von Bennhold haben ferner gezeigt, daß diese Bindungen in gewissen Organen gelöst werden können und daß dann an diesen Stellen die „abgehängten" Stoffe ausgeschieden werden oder zur Wirkung gelangen können. Unter den vielen von Bennhold beschriebenen Bindungen an Bluteiweißkörper interessiert in unserem Zusammenhang vor allem das Verhalten von anderen Stoffen, die wie die Digitalisglykoside in die Gruppe der Steroide gehören. Das Cholesterin wird an die Globuline gebunden. Für die Gallensäuren scheinen noch keine Angaben vorzuliegen. Da sie aber gewisse Stoffe aus ihrer Bindung an Albumine verdrängen können, besitzen sie vielleicht selbst eine Affinität zu diesen. Für das weibliche Sexualhormon hat Brunelli[22] kurz angegeben, daß sie an Albumine gebunden wird. Auch saure Farbstoffe, die in ihrem Bindungsverhalten viel Ähnlichkeiten mit den Digitalisglykosiden zeigen, werden gleichfalls an die Albumine gebunden.

R. A. Hoekstra[5, 6], der die Bindung der Digitalisstoffe an Serumeiweißbindungen zuletzt systematisch studiert hat, stellte auch schon die Frage, ob durch diese Bindung denn das Eindringen dieser Komplexe in die Zellen verhindert werden könne. Er versuchte in mehreren Untersuchungen nachzuweisen, daß diese Komplexe entsprechend den Vorstellungen von de Haan[23] die Zellenmembran passieren, im Organismus gespeichert werden und zur Wirkung kommen. Nur wenn die Bindung des Glykosids an artfremdes Eiweiß erfolgt, kann der Komplex nicht durch die Zellmembran hindurchtreten und erscheint unwirksam.

Genuit und Eschbach[9] haben die Bindung von Digitoxin und Strophanthin in Passageversuchen am isolierten durchströmten Meerschweinchenherzen ohne und mit Zusatz von arteigenem und artfremdem Serumeiweiß studiert*. Sie fanden dabei keine absoluten Unterschiede, sondern nur zeitliche Abweichungen. Sie nehmen daher an, daß diese Bindung der Glykoside an Eiweiß im Gewebe gelöst werden könne und daß das Glykosid somit vielleicht von einem Eiweißmolekül an ein anderes, nämlich des Gewebes weitergereicht wird.

Mit diesen letzten Andeutungen ist die Frage nach dem Bindungsmechanismus zwischen Digitalisglykosiden und Albuminen berührt. Die

[22] Brunelli, zit. nach Bennhold, Kylin u. Rusznyak: Eiweißkörper des Blutplasmas. Dresden 1938.

[23] de Haan: Pflügers Arch. **201**, 393 (1923).

* Anmerkung: Bei neueren ähnlichen Passageversuchen am Kaninchenherzen konnte Genuit (noch unveröffentlicht) feststellen, daß von Strophanthin nur etwa 2 γ pro 1 g Herz gebunden werden. Das würde bedeuten, daß 2 γ pro 100—150 mg Zelleiweiß gebunden werden. Dieser wesentlich geringere Wert für das Bindungsvermögen im Vergleich zu den errechneten Bindungsgrößen an Serumalbumin, erklärt sich wohl nicht aus einer geringeren Bindungsfähigkeit von Herzmuskeleiweiß, sondern vermutlich daraus, daß das Eindringen der Glykoside sehr langsam verläuft und daß es sich hier mehr um eine Bindung an die Eiweißbestandteile der Zellmembran als des Zellplasmas handeln wird.

Ergebnisse neuer Untersuchungen, die sich mit dieser Aufgabe beschäftigten, folgen in einer späteren Mitteilung.

Zusammenfassung.

Die näheren Bedingungen der Bindung von Digitalisglykosiden an die Serumeiweißstoffe wurden mittels Austauschdialyse und stufenphotometrischer, quantitativer Bestimmung der Glykoside ermittelt. Die Bindung erfolgte nur an die Albumine; Pseudoglobuline und Euglobuline binden praktisch nicht. Auch an das Hämoglobin werden die Glykoside nicht gebunden. Die einzelnen Glykosidarten zeigen dabei ein quantitativ verschiedenes Bindungsvermögen, aber keine grundsätzlichen Unterschiede. Auch die verschiedenen Strophanthinarten und die Genine werden gebunden.

Serum bindet Digitoxin etwas stärker, als seinem Albumingehalt entspricht. Einzelne Albuminarten zeigen keine wesentlichen Abweichungen des Bindungsvermögens. Rechnerische Betrachtungen zeigen, daß pro 1 g Albumin bis 9 mg Digitoxin gebunden werden konnten. Unter Bedingungen der therapeutischen Dosierung dürfte für die Serumeiweißkörper wohl nie der Zustand der Bindungssättigung erreicht werden. Praktisch bedeutet das, daß alles in vivo in der Blutbahn befindliche Glykosid an das Albumin gebunden ist. Dadurch wird aber die Speicherungsmöglichkeit im Organismus und die Wirksamkeit der Glykoside nicht beeinträchtigt.

Das in dieser Arbeit verwendete Stufenphotometer der Firma Zeiss, Jena wurde uns von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Direktor: Prof. Dr. L. Lendle).

Über die Bedeutung der Wasserlöslichkeit von Geninen und Glykosiden aus der Gruppe des Digitoxins und k-Strophantins für ihre Adsorptionsfähigkeit.

Von

K. Korfmacher.

(Eingegangen am 10. November 1939.)

Die chemische Erforschung der Digitalisverbindungen hat in den letzten Jahren Kenntnisse vermittelt über die Art der natürlich vorkommenden Glykosidverbindungen (Stoll und Mitarbeiter[1]) und deren Abbaustufen bis zu den spezifischen Grundstoffen, den Geninen. So ist es Stoll[2] im vergangenen Jahre geglückt, für das amorphe k-Strophanthin nachzuweisen, daß es ein Gemisch ist von mehr oder weniger zuckerreichen Derivaten des Cymarins, nämlich von k-Strophanthin-β mit 1 Mol Glucose und dem Strophanthosid mit 2 Mol Glucose mehr als Cymarin.

W. Neumann[3], der sich auch mit der Frage des Glykosidaufbaues aus den Geninstufen beschäftigte, konnte bei seinen Untersuchungen über die quantitativen Wirksamkeitsverhältnisse solcher verschiedener Glykosidstufen die interessante Beobachtung von Straub[4] bestätigen, daß mit der Glykosidbildung eine erhebliche Wirksamkeitssteigerung eintritt, daß darüber hinaus mit dem Fortschreiten zu glucosereicheren Stoffen, den genuinen Glykosiden, die Wirksamkeit aber noch zunimmt. Aus seinen Ergebnissen mögen nur kurz die folgenden Zahlenangaben entnommen werden, bei welchen die Wirksamkeit auf molare Verhältnisse bezogen ist und die Wirksamkeit des Genins mit 1 angesetzt wurde.

Digitoxigenin : Digitoxin : Digilanid A = 1 : 11 : 35,0.
Gitoxigenin : Gitoxin : Digilanid B = 1 : 12 : 23,5.
k-Strophanthidin : Cymarin : amorphes k-Strophanthin 1 : 12 : 23,5.

Eine Erklärung für diese Wirksamkeitsunterschiede ist von Straub[5], soweit das Verhältnis der Wirksamkeit von Genin und Glykosid in Frage kommt, früher unter Hinweis auf die geringere Haftfähigkeit der weniger leicht wasserlöslichen Geninverbindung gegeben worden. Damit im Zusammenhang wurde auch der Eliminationsvorgang als einfache hydro-

[1] Stoll, A.: The Cardiac Glykosids. London 1937; Schweiz. med. Wschr. **1937**, S. 855. [2] Stoll, A., J. Renz u. W. Kreis: Helvet. chem. Acta **20**, 1484 (1938). [3] Neumann, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 329 (1937). [4] Straub, W.: Biochem. Z. **75**, 138 (1916). [5] Straub, W.: in Fraenkel, Der Weg zur rationellen Ther. Leipzig 1933, S. 46.

lytische Spaltung der Glykoside betrachtet. Gegen diese Auffassung bestehen heute auf Grund neuer Erfahrungen gewisse Bedenken (vgl. Neumann[6] und Lendle[7]).

Es muß auch schon bei der Annahme, daß die Digitalisbindung der Glykoside auf chemischen Affinitäten beruhe, als unwahrscheinlich gelten, daß die Abspaltung des Zuckers plötzlich diese Verankerung lösen sollte. Dagegen würde eine nur adsorptive Bindung sich unter diesen Umständen eher lösen können. Nun ist es aber wiederum etwas unwahrscheinlich, daß eine lipoidlösliche Verbindung, wie das Genin, einer mehr wasserlöslichen Verbindung, wie dem Glykosid, an Adsorptionsfähigkeit unterlegen sein sollte, welche Annahme bei obiger Theorie notwendig wäre. Es schien wünschenswert, die Adsorptionsfähigkeit von Geninen und Glykosiden in obiger Reihe der Digitoxin- und Strophanthinverbindungen einmal systematisch zu prüfen. Dabei war es wichtig zu erfahren, ob etwa die gleichen Unterschiede der Adsorptionsfähigkeit nach Richtung und Ausmaß vorliegen wie bei Neumanns[3] Angaben über die Wirksamkeit. Eine solche Parallele könnte dann auch in dem Sinne verwendet werden, daß daraus die einfache Adsorption als wichtige Voraussetzung der biologischen Wirkung zu erkennen wäre.

Die von Lendle[8] und Mitarbeitern[9,10] mehrfach verwertete quantitative Bestimmungsmethode für Reinglykoside mittels der Baljetschen Reaktion konnte bei solchen Versuchen leicht ein größeres experimentelles Material liefern als die früher für ähnliche Aufgaben verwendeten biologischen Testreaktionen mit ihren größeren Fehlerquellen.

Es möge hier zunächst ein kurzer Überblick folgen über die bisher in der Literatur vorliegenden Angaben über die Adsorptionsfähigkeit von Digitalisverbindungen.

Die ersten systematischen Untersuchungen dieser Art stammen von M. Walther[11], die, wegen des verschiedenen gegenseitigen elektrischen Verhaltens von Adsorptionsmittel und Adsorbendum, mehrere typische Adsorbentien, z. B. Kohle als wirksamstes und vielseitigstes Adsorbens mit wenig ausgesprochener elektrischer Ladung, Bolus alba als Typus mit negativer Ladung und Aluminium oxydatum anhydricum als positiv geladenes Adsorptionsmittel in ihrem Verhalten zu Glykosiden studierte. Die Versuche wurden mit 50 ccm wässeriger Lösung unter sechsstündigem Schütteln bei Zimmertemperatur ausgeführt, wobei unter Vermeidung eines Zusatzes von Alkohol (wegen seines angeblichen Einflusses auf die Adsorption) nur wasserlösliche Glykoside zur Anwendung gelangten. Die Ergebnisse zeigten eine besonders gute Adsorption an Blutkohle, dagegen

[6] Neumann, W.: Dissertation Würzburg 1934. — [7] Lendle, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **175**, 719 (1934); **182**, 72 (1936). — [8] Lendle, L., u. Fr. Pusch: Ebenda **177**, 551 (1935). — [9] Hauschild, Fr.: Ebenda **179**, 255 (1935). — [10] Hagemeier: Ebenda **194**, 195 (1939). — [11] Walther, M.: Biochem. Z. **92**, 762 (1918).

wurden verschwindend kleine Mengen an Bolus adsorbiert. Die Adsorbierfähigkeit des positiv geladenen Aluminiumoxyds entsprach ungefähr derjenigen der Blutkohle.

Die zur Ermittlung eines „Adsorptionskoeffizienten" notwendige gesetzmäßige Abhängigkeit der Adsorptionsgrößen von den Glykosidkonzentrationen konnte dabei nicht festgestellt werden. Bei der Prüfung des Ladungscharakters der untersuchten Glykoside im Kataphoreseversuch zeigte ihre Wanderungsrichtung im Potentialgefälle eine Tendenz zum Anodenraum. Auf Grund dieses Verhaltens wurde den Glykosiden eine negative Ladung zugeschrieben. Die Adsorptionsunfähigkeit der Glykoside an Bolus hätte ebenfalls einen Hinweis in dieser Richtung geben können.

H. Fischer[12] beobachtete bei Versuchen über Fixation und Haftfestigkeit des Digitoxins an Tierkohle, daß von dem gebundenen Digitoxin nur 80% wieder aus seiner Bindung durch Chloroform ausgeschüttelt werden konnten, daß dagegen das Gitoxigenin (Bigitaligenin) 100%ig reversibel fixiert war. Diese Feststellung entspricht der biologischen Wirkung. Trotz der aus diesem spezifischen Unterschied in der Haftfestigkeit beider Digitalisstoffe am Kohlemodell festzustellenden Parallele zur Haftfestigkeit in vivo schließt Fischer aber auf Grund weiterer Untersuchungen am biologischen Substrat auf chemische Bindungsvorgänge als Grundlage der Wirkung.

Ähnliche von Heyden[13] mit anorganischem Material (Tierkohle, Bolus alba, Asbestfasern, Quarzsand) ausgeführte Digitoxinbindungsversuche ergaben unter Anwendung anderer Mengenverhältnisse (2 g Adsorbens + 1 mg Digitoxin), daß 80% der angebotenen Digitoxinmenge irreversibel an Tierkohle gebunden wurden, während das übrige Material entweder überhaupt kein Digitoxin zu binden vermochte, oder — wie die 20%ig reversibel bindenden Asbestfasern — das Digitoxin beim Ausziehen mit Chloroform fast restlos wieder freigaben.

Vor einigen Jahren erörterte Pusch[14] erneut die Frage nach der adsorptiven Bindung der Glykoside und Genine. An Aluminiumhydroxyd wurden Digitoxin und sein Genin nicht gebunden, dagegen Strophanthin. Eisenhydroxyd und Kaolin verhielten sich umgekehrt. Daraus ergab sich also ein wesentlicher Adsorptionsunterschied zwischen Strophanthin und Digitoxin. Außerdem prüfte Pusch die Adsorptionsfähigkeit in Gegenwart von Eiweißstoffen. Nur am Aluminium trat dabei eine Änderung der Adsorption ein: Die Digitoxinbindung war verstärkt, die Bindung des Strophanthins wurde abgeschwächt. Parallelversuche mit Farbstoffen von verschiedener Ladung gestatteten bei gleichen Versuchsbedingungen keinen Vergleich mit diesen Ergebnissen, so daß auch die Frage des Ladungs-

[12] Fischer, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **139**, 111 (1928). — [13] Heyden: Ebenda **164**, 293 (1932). — [14] Pusch, Fr.: Ebenda **177**, 564 (1935).

charakters der verschiedenen Glykoside nicht eindeutig beantwortet werden konnte. Hinsichtlich der Aufstellung eines Adsorptionskoeffizienten wurden die bereits erwähnten Feststellungen Walthers[11] bestätigt.

Nach diesem Überblick über die bisher vorliegenden Ergebnisse verschiedener Forscher kommt man zusammenfassend zu dem Schluß, daß die adsorptiven Eigenschaften der Glykoside wohl nur bis zu einem gewissen Grade ihre biologischen Wirkungsbedingungen erklären können.

Im folgenden wurde die Frage der adsorptiven Digitalisbindung erneut aufgenommen unter dem besonderen Gesichtspunkt der Abhängigkeit der Adsorptionsfähigkeit einiger Glykoside und Genine aus der Gruppe des Digitoxins und des k-Strophanthins von deren Wasserlöslichkeit. Nach den neuen Forschungsergebnissen[1,2] über die Abbaustufen solcher herzwirksamer Glykoside von den „genuinen" Glykosiden bis zu den Geninen (Stoll) standen derartige Reinstoffe von verschiedener Wasserlöslichkeit und Wirksamkeit zur Verfügung*.

Da die Adsorption selbst nicht nur eine Frage der morphologischen Beschaffenheit des Adsorbens und der Oberflächenaktivität des Adsorbendums darstellt, sondern auch der Ausdruck besonderer elektrischer Ladungsverhältnisse sein kann, wählten wir nach diesen Gesichtspunkten verschiedene Adsorbentien aus (Aluminiumoxyd, Kaolin, Kieselsäure und Tierkohle). Damit war gleichzeitig die Möglichkeit gegeben, die Ergebnisse auch hinsichtlich des Ladungscharakters auszuwerten.

Über die Wasserlöslichkeit der bei unseren Versuchen benutzten Glykoside und Genine ist folgendes zu sagen: Digitoxigenin ist praktisch wasserunlöslich, Digitoxin sehr schlecht löslich, während das Purpureaglykosid A eine Löslichkeit von 1 : 3000 besitzt. Strophanthidin ist fast unlöslich in Wasser und Cymarin ebenfalls schlecht löslich. Die Löslichkeit des g-Strophanthins beträgt 1 : 100; k-Strophanthin und Strophanthosid sind gut wasserlöslich.

I. Methodik.

Als Adsorbentien dienten:

1. Kieselsäure (1%ig) als Typus des ausgesprochen negativ geladenen Adsorptionsmittels.

2. Das negativ geladene Kaolin (1%ig).

3. Die keinen besonderen Ladungscharakter aufweisende Tierkohle (0,01%ig).

4. Aluminium oxydatum anhydricum (1%ig) als Vertreter der Adsorbentien mit positiver Ladung.

* Wir verdanken diese Reinstoffe der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Stoll (Sandoz) und Herrn Prof. Fromherz (La Roche).

Die in äquimolaren Konzentrationen untersuchten Glykoside und deren Genine waren folgende:

I. Für die Digitoxinreihe:
   1. Purpureaglykosid A.
   2. Digitoxin.
   3. Digitoxigenin.

II. Für die Strophanthinreihe:
   1. k-Strophanthosid.
   2. k-Strophanthin (Boehringer).
   3. Cymarin.
   4. k-Strophanthidin.
   5. g-Strophanthin.

Von den genannten Digitaliskörpern und Digitaloiden wurden gleiche Stammlösungen (1 : 10000) mit 30%igem Alkohol als Lösungsmittel hergestellt. 2 ccm $^1/_{10000}$ molarer Konzentrationen füllten wir mit 8 ccm Suspension eines der benutzten Adsorbentien auf 10 ccm auf, so daß die Glykosid-Endkonzentration $^1/_{50000}$ molar resultierte. Diese Mischungen wurden in geeigneten Fläschchen mittels einer Schüttelmaschine 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur geschüttelt und anschließend zweimal durch gehärtete Filter filtriert. Zur Beseitigung etwa noch im Filtrat vorhandener Adsorbensteilchen wurde dieses außerdem 30 Minuten lang zentrifugiert, da bei den verschwindend niedrigen Glykosidkonzentrationen die geringsten Durchlässigkeitsunterschiede der einzelnen Filter – z. B. bei der Tierkohle – schon merkliche Abweichungen verursachten. Bei den unvermeidlichen, verhältnismäßig jedoch belanglosen Trübungen (z. B. Kaolin) brachten wir den für jedes Adsorbens festgestellten Leerwert in Abzug.

Zur quantitativen Ermittlung der Reinglykoside bedienten wir uns der bekannten kolorimetrischen Bestimmung auf Grund der von Baljet[15] angegebenen und von Knudson und Dressbach[16] ausgearbeiteten Farbreaktion mit alkalischer Pikrinsäure. 5 ccm des über dem Bodensatz stehenden Zentrifugats wurden abgehebert, mit gleichen Teilen alkalischer Pikrinsäurelösung (19 ccm 1%ige Pikrinsäurelösung + 1 ccm 10%ige NaOH) versetzt und in dieser Form zur quantitativen Glykosidbestimmung verwendet. Als Vergleichslösung nahmen wir statt Kaliumbichromat eine Mischung der alkalischen Pikrinsäure und Aqua dest. aa, da diese Lösung eine direkte Ablesung des Extinktionswertes am Pulfrich-Photometer* erlaubt. Die Ablesungen erfolgten entsprechend dem Maximum der Farb

[15] Baljet, H. B.: Schweiz. Apoth.-Ztg. **56**, 71, 84 (1918). — Pharmaz. Weekbl 1918, 457. — [16] Knudson, A. u. M. Dresbach: J. of Pharmacol. **19**, 2 8 (1922); **20**, 205 (1922).

* Das in dieser Arbeit verwendete Stufenphotometer der Firma Zeiss, Jena, wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

tiefe 15- -20 Minuten nach Zusatz der alkalischen Pikrinsäurelösung. Das Verfahren ist in einer vorausgehenden Arbeit von Hagemeier[10] genauer beschrieben worden. Die für die gleichen Versuchsbedingungen und die gleichen Reinglykoside von Hagemeier aufgestellten Faktoren dienten hier zur Berechnung der festzustellenden Konzentrationen aus den Ablesungen. Aus der Differenz zwischen vorgelegter und wiedergefundener Glykosidmenge ermittelten wir die Adsorptionsgröße. Es sei noch erwähnt, daß das Filtrat durch die Vorbehandlung selbst keine Verluste aufzuweisen hatte, die etwa auf Filteradsorption und dgl. zurückzuführen wären. So wurden z. B. im Kieselsäureversuch (Tabelle 1) die vorgelegten Mengen restlos wiedergefunden.

II. Adsorption an verschiedenem Material.

Nach den in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnissen gehen die untersuchten Stoffe mit der Kieselsäure trotz recht hoher Konzentration der Suspension keine adsorptive Bindung ein, was mit den Untersuchungsergebnissen Heydens[13] übereinstimmt. Wegen dieses indifferenten Verhaltens bietet die Kieselsäure natürlich keine Möglichkeit zur Behandlung des dieser Arbeit zugrunde liegenden Themas. Die in Tabelle 1 vorgelegten Befunde zeigen aber beiläufig die Genauigkeit der verwendeten Methode.

Tabelle 1. Adsorption an Kieselsäure (0,7%ig).

Glykoside	Vorgelegt mg %	Gefunden mg %	Gebunden mg %	Gebunden in %
Purpureaglykosid A	1,853	1,852	0,001	0,00
		1,853	0,000	
		1,854	— 0,001	
Digitoxin	1,529	1,530	— 0,001	0,52
		1,515	0,014	
		1,519	0,010	
Digitoxigenin	0,748	0,741	0,007	— 0,53
		0,755	— 0,007	
		0,761	— 0,013	
k-Strophanthosid	1,745	1,747	— 0,002	— 0,23
		1,756	— 0,011	
		1,745	0,000	
k-Strophanthin	1,421	1,430	— 0,009	— 0,07
		1,425	— 0,004	
		1,411	0,010	
Cymarin	1,096	1,098	— 0,002	0,08
		1,105	— 0,009	
		1,080	0,016	
k-Strophanthidin	0,827	0,835	— 0,008	0,61
		0,815	0,015	
		0,821	0,006	
g-Strophanthin	1,169	1,175	— 0,006	0,34
		1,165	0,004	
		1,154	0,015	

Von der Tatsache ausgehend, daß ganz allgemein bei der Adsorption auch elektrische Ladungsverhältnisse eine Rolle spielen, wäre den Glykosiden und ihren Geninen auf Grund ihrer Adsorptionsunfähigkeit an Kieselsäure entsprechend den bisher schon mehrfach gemachten Erfahrungen eine positive Ladung abzusprechen.

Kaolin (siehe Tabelle 2) bindet die Digitoxinstoffe und Strophanthinverbindungen zu einem Prozentsatz, der zwischen 17 und 40 variiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen Puschs [14] weist die Digitoxinreihe

Tabelle 2. Adsorption an Kaolin (0,7%ig).

Glykoside	Vorgelegt mg %	Gefunden mg %	Gebunden mg %	Gebunden in %
Purpureaglykosid A	1,853	1,120	0,733	39,6
		1,157	0,696	37,6
Digitoxin	1,529	1,022	0,507	32,6
		1,052	0,477	30,7
Digitoxigenin	0,748	0,500	0,248	33,3
		0,504	0,244	32,7
k-Strophanthosid	1,745	1,312	0,433	24,8
		1,344	0,401	23,0
k-Strophanthin	1,421	1,103	0,318	22,4
		1,151	0,270	19,0
Cymarin	1,096	0,895	0,201	18,4
		0,906	0,190	17,4
k-Strophanthidin	0,827	0,525	0,302	36,5
		0,538	0,289	35,0
g-Strophanthin	1,169	0,916	0,253	21,6
		0,941	0,228	19,5

gegenüber der Strophanthinreihe eine stärkere Adsorption auf. Nur das Strophanthidin zeigt Adsorptionswerte, die denen des Purpureaglykosids A fast gleichkommen. Cymarin wird am wenigsten adsorbiert (17,9%). Purpureaglykosid A und Strophanthidin dagegen am stärksten (38,6%). In diesen Versuchen lassen sich keine typischen Unterschiede im Verhalten der einzelnen Verbindungen gemäß ihrer Wasserlöslichkeit nachweisen, die ihrer biologischen Wirksamkeit entsprächen.

Bei Beurteilung dieser Ergebnisse vom Standpunkte der Ladungsfrage müßte die aus dem Kieselsäureversuch abgeleitete Annahme, daß bei den untersuchten Stoffen wohl keine positive Ladung vorliegen könne, eine Einschränkung erfahren. Vielleicht ist die Ursache der festgestellten Bindung am Kaolin in einer weniger ausgesprochen negativen Ladung dieses Adsorbens zu suchen, wodurch die Wirkung der Oberflächenaktivität stärker zur Geltung kommen könnte. Unter dieser Voraussetzung wäre dann der Digitoxinreihe einschließlich dem Strophanthidin gegenüber den übrigen Stufen der Strophanthinreihe eine mehr positive bzw. eine weniger negative Ladung zuzuschreiben.

Tabelle 3. Adsorption an Aluminium oxydatum (0,7%ig).

Glykoside	Vorgelegt mg %	Gefunden mg %	Gebunden mg %	Gebunden in %	
Purpureaglykosid A	1,853	0,694 0,712	1,159 1,141	62,4 61,6	62,0
Digitoxin	1,529	0,760 0,760	0,769 0,769	50,3 50,3	50,3
Digitoxigenin	0,748	0,291 0,299	0,457 0,449	61,1 60,1	60,6
k-Strophanthosid	1,745	0,650 0,666	1,095 1,079	62,8 61,8	62,3
k-Strophanthin	1,421	0,689 0,701	0,732 0,720	51,4 50,6	51,0
Cymarin	1,096	0,480 0,512	0,616 0,584	56,2 53,2	54,7
k-Strophanthidin	0,827	0,351 0,351	0,476 0,476	57,4 57,4	57,4
g-Strophanthin	1,169	0,549 0,563	0,620 0,606	53,1 51,8	52,5

Das Aluminiumoxyd (Tabelle 3) übt schon eine bedeutend stärker adsorbierende Wirkung aus. Man findet Bindungswerte, die zwischen 50 und 60 v. H. liegen. Die zuckerreichen Stoffe werden gleich ihren Geninen relativ am stärksten adsorbiert, während die mittleren Abbaustufen (Digitoxin, Strophanthin, Cymarin) Werte um 50% haben. Auch hier tritt kein wesentlicher Unterschied im Verhalten der einzelnen Stoffe zutage.

Die höheren Adsorptionswerte für das positiv geladene Aluminiumoxyd widersprechen nicht unserer Annahme, daß die Glykoside und Genine wahrscheinlich keine positive Ladung besitzen.

Die Tierkohle adsorbiert sehr stark, so daß kleinste Konzentrationen der Suspension für die Prüfung verwendet werden mußten. Bei den Versuchen läßt sich ein Gang erkennen. Mit abnehmendem Zuckerreichtum der Glykoside erfolgt eine entsprechend stärkere Adsorption, die im Versuch mit 0,007%iger Tierkohle (Tabelle 4) für Purpureaglykosid A Werte um 47% ergibt und steigend mit dem Digitoxin (60%) bei seinem Genin (92%) einen Höhepunkt erreicht. Dagegen sind diese Unterschiede nicht so ausgesprochen in der Strophanthinreihe.

Tabelle 5 zeigt die Versuchsergebnisse für 0,014%ige Tierkohle. Hier machen sich die Unterschiede noch deutlicher geltend. Die lipoidlöslicheren Stoffe werden also gegenüber den mehr wasserlöslichen stärker gebunden. Zur Erklärung ihrer biologischen Wirksamkeit, soweit diese überhaupt eine Adsorptionsfrage darstellt, hatten wir nach den eingangs niedergelegten Erwägungen gerade das Gegenteil dieser Ergebnisse erwartet. Auf jeden Fall aber zeigen diese Versuche am Kohlemodell, bei dem die Adsorption weniger der Ausdruck besonderer Ladungs-

Tabelle 4. Adsorption an Tierkohle (0,007%ig).

Glykoside	Vorgelegt mg %	Gefunden mg %	Gebunden mg %	Gebunden in %
Purpureaglykosid A	1,853	0,959	0,894	48,4
		0,959	0,894	48,4
		1,012	0,841	45,5
		0,975	0,878	47,4
Digitoxin	1,529	0,634	0,895	58,6
		0,634	0,895	58,6
		0,576	0,953	62,3
		0,634	0,895	58,6
Digitoxigenin	0,748	0,053	0,695	92,8
		0,044	0,704	94,1
		0,055	0,693	92,6
		0,090	0,658	88,0
k-Strophanthosid	1,745	0,553	1,192	68,2
		0,530	1,215	69,5
		0,571	1,174	67,1
		0,556	1,189	68,1
k-Strophanthin	1,421	0,423	0,998	70,2
		0,423	0,998	70,2
		0,404	1,017	71,6
		0,417	1,004	70,7
Cymarin	1,096	0,153	0,943	86,1
		0,164	0,932	85,0
		0,142	0,954	87,1
		0,180	0,916	83,6
k-Strophanthidin	0,827	0,128	0,699	84,6
		0,111	0,716	86,6
		0,119	0,708	85,6
		0,136	0,691	83,6
g-Strophanthin	1,169	0,254	0,915	78,2
		0,286	0,883	75,5
		0,313	0,856	73,2
		0,274	0,895	75,6

verschiedenheiten zwischen Adsorbens und Adsorbendum, als vielmehr eine Folge der Oberflächenaktivität der untersuchten Stoffe ist, daß die Wasserlöslichkeit für die Adsorptionsfähigkeit immerhin eine gewisse Rolle spielt, die allerdings zur Wirksamkeit der Genine und Glykoside eher in einem gegenteiligen Verhältnis steht.

III. Adsorptionszeit.

Zur Erreichung des Adsorptionsmaximums bedarf es einer gewissen Einwirkungszeit, wie bei zeitlich befristeten Schüttelversuchen festgestellt werden konnte. In Tabelle 6 sind die Adsorptionswerte bei verschieden langer Einwirkungszeit (nach kurzem und nach einstündigem Schütteln) angegeben. Die Digitoxinreihe erreicht dabei schon sehr schnell ihre maximalen Bindungswerte, während die Strophanthinreihe eine gewisse Zeit benötigt, um maximal adsorbiert zu werden.

Tabelle 5. Adsorption an Tierkohle (0,014%ig).

Glykoside	Vorgelegt mg %	Gefunden mg %	Gebunden mg %	Gebunden in %
Purpureaglykosid A	1,853	0,761	1,092	58,8
		0,733	1,120	60,4
Digitoxin	1,529	0,185	1,344	88,0
		0,185	1,344	88,0
Digitoxigenin	0,748	0,015	0,737	98,5
		0,015	0,737	98,5
k-Strophanthosid	1,745	0,323	1,422	81,6
		0,341	1,404	80,6
k-Strophanthin	1,421	0,224	1,197	84,3
		0,256	1,165	82,1
Cymarin	1,096	0,054	1,042	95,3
		0,054	1,042	95,3
k-Strophanthidin	0,827	0,078	0,749	90,7
		0,086	0,741	89,9
g-Strophanthin	1,169	0,252	0,917	78,4
		0,286	0,883	75,6

Tabelle 6. Adsorption von Glykosiden an Tierkohle und Aluminiumoxyd bei verschieden langer Einwirkungszeit. (Tierkohle 0,014%ig, Aluminiumoxyd 0,7%ig.)

Glykoside	Vorgelegt mg %	Tierkohle		*	Aluminiumoxyd		*
		Gebunden mg %	Gebunden in %, kurz gesch.		Gebunden mg %	Gebunden in %, kurz gesch.	
Purpureaglykosid A	1,853	—	—	47,4	0,846	46,1	62,0
Digitoxin	1,529	0,849	55,5	59,5	0,629	41,2	50,3
Digitoxigenin	0,748	0,532	71,2	91,9	0,273	36,6	60,6
k-Strophanthosid	1,745	0,688	39,4	68,2	0,614	35,2	62,3
k-Strophanthin	1,421	0,412	29,2	70,7	0,378	26,8	51,0
Cymarin	1,096	0,674	63,1	85,5	0,364	34,1	54,7
k-Strophanthidin	0,827	0,466	56,7	85,2	0,281	34,0	57,4
g-Strophanthin	1,169	0,402	34,4	75,9	0,318	27,2	52,5

* Werte nach einstündigem Schütteln (vgl. Tabelle 3 u. 4).

Auch diese Feststellung stimmt nicht überein mit der allgemeinen Annahme — besonders auf Grund klinischer Erfahrungen - , daß Strophanthin bei intravenöser Injektion in vivo schneller wirksam wird als Digitoxin.

IV. Adsorptionsverdrängung.

Der Einfluß der Galle und der Gallensäuren auf die Adsorptionsfähigkeit der Glykoside, geprüft an Tierkohle, machte sich entsprechend unseren Erwartungen im Sinne einer Verdrängung geltend, da die Gallensäuren eine relativ größere Oberflächenaktivität besitzen.

Die Versuchsreihe wurde nur mit Digitoxin und k-Strophanthin ausgeführt, um auf einfacherem Wege zu prinzipiellen Unterschieden zu gelangen. Die Verdrängung wurde mit dem Merckschen Präparat Fel Tauri dep. sicc. und mit chemisch reinem desoxycholsaurem Natrium in verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Die Desoxycholsäure (Tabelle 7) übt eine sehr stark verdrängende Wirkung aus. Rund 85% der zuvor adsorbierten Glykoside werden durch 0.1 %ige Desoxycholsäure von der Tierkohle wieder losgelöst. 0.01 %ige Galle verdrängt die Glykoside in einem nicht so starken Maße (Tabelle 8 u. 9). Prüft man in allen Versuchen vergleichend das Digitoxin und das Strophanthin, so kommt man zu dem Ergebnis, daß das Strophanthin sich etwas stärker verdrängen läßt.

Tabelle 7. Verdrängung des Digitoxins und Strophanthins von der Tierkohle bei Anwesenheit der Desoxycholsäure in verschiedenen Konzentrationen (vorgelegt 2 mg%; Endkonzentration der Tierkohle 0,03%ig) Glykosid.

Glykoside	Desoxycholsäure %	Gefunden mg %	Gebunden mg %	Gebunden in %
Digitoxin	0,000	0,025	1,975	98,8
	0,001	0,176	1,824	91,2
	0,01	1,129	0,871	43,6
	0,1	1,653	0,347	17,4
k-Strophanthin	0,000	0,032	1,968	98,4
	0,001	0,336	1,664	83,2
	0,01	1,321	0,679	34,0
	0,1	1,731	0,287	14,1

Tabelle 8. Adsorption an Tierkohle bei Zusatz von Galle (Tierkohle 0,01%ig).

Glykoside	Gefunden mg %	Gebunden mg %	Gebunden in %
Digitoxin	1,180	0,820	41,0
	1,180	0,820	41,0
Digitoxin + 0,01% Galle	1,320	0,680	34,0
	1,200	0,800	40,0
k-Strophanthin	1,218	0,782	39,1
	1,264	0,736	36,8
k-Strophanthin + 0,01% Galle	1,458	0,542	27,1
	1,440	0,560	28,0

Zusammenfassung.

Die in ihren Ursachen bisher noch nicht geklärte Tatsache, daß die herzwirksamen Glykosidstoffe mit abnehmendem Zuckeranteil im Molekül auch in sehr starkem Ausmaß ihre Wirksamkeit einbüßen, führte zu der

Tabelle 9. Adsorption an Tierkohle bei Zusatz von Galle (Tierkohle 0,02%ig).

Glykoside	Gefunden mg %	Gebunden mg %	Gebunden in %
Digitoxin	0,770	1,230	61,5
	0,800	1,200	60,0
	0,785	1,215	60,8
Digitoxin + 0,01% Galle	0,915	1,085	54,3
	0,915	1,085	54,3
	0,915	1,085	54,3
k-Strophanthin	0,920	1,080	54,0
	0,958	1,042	52,1
	0,935	1,065	53,3
k-Strophanthin + 0,01% Galle	1,360	0,640	32,0
	1,390	0,610	30,5
	1,375	0,625	31,3

Hypothese, daß die zuckerärmeren oder zuckerfreien Verbindungen, also die weniger leicht wasserlöslichen Abbaustufen der genuinen Glykoside, eine geringere Haftfähigkeit besitzen. Die Art dieser Glykosidbindung hat noch keine genügende Aufklärung gefunden. Die Annahme der adsorptiven Bindung als wichtige Voraussetzung der biologischen Wirkung führte uns zu der Frage, ob die Wasserlöslichkeit der einzelnen Glykoside und Genine auch in vitro für ihre Adsorptionsfähigkeit eine Rolle spielt, die dieser Annahme entsprechen könnte. Nach den vorgelegten Versuchsergebnissen ist die Frage zu verneinen. Bei den Adsorptionsmitteln mit ausgesprochener elektrischer Ladung ließ die Adsorption überhaupt keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Die Adsorption an Tierkohle erfolgte dagegen in einer gewissen Abhängigkeit von der Wasserlöslichkeit der untersuchten Verbindungen; sie widersprach aber unseren Erwartungen: Die schwerer wasserlöslichen Genine, also die Stoffe mit schwächster Wirkung wurden gegenüber den mehr wasserlöslichen, wirksameren Verbindungen stärker adsorbiert.

Es wurde dabei auch festgestellt, daß die verschiedenen Wirkstoffe, besonders die der Strophanthinreihe, zur Erreichung ihrer maximalen Adsorptionswerte eine gewisse Einwirkungszeit benötigen. Nach einstündigem Schütteln kann die Bindung als abgeschlossen betrachtet werden. Die Stoffe der Digitoxinreihe waren aber schon nach wenigen Minuten erschöpfend gebunden.

Bei der Prüfung der Adsorptionsgröße dieser Stoffe unter Einwirkung von Galle oder Gallensäuren zeigte sich, daß besonders die Gallensäuren eine stark verdrängende Wirkung ausüben, die die Glykosidbindungen wieder von der Tierkohle lösen. Dabei ließ sich das Strophanthin etwas leichter verdrängen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. Westf. (Direktor: Prof. Dr. L. Lendle.)

Bedingungen der Bindung von Digitalisglykosiden an die Serumeiweißstoffe.

Von

W. Haarmann, K. Korfmacher und L. Lendle.

(Eingegangen am 10. November 1939.)

In einer vorausgehenden Arbeit[1] konnte gezeigt werden, daß die Bindung der Digitalisglykoside an die Albuminfraktion des Serumeiweißes erfolgt. Nach den ermittelten Mengenverhältnissen der Bindung werden sehr große Mengen an die Albumine gebunden, so daß bei der Zufuhr der Glykoside in vivo diese Reaktion eine hemmende Rolle spielen müßte, falls die Bindung nicht reversibler Natur ist. Es muß angenommen werden, daß die Glykoside unter gewissen Umständen von den Eiweißmolekülen wieder abgelöst werden können und am spezifischen Wirkungsort ihre Bindung vielleicht mit einem ähnlichen Substrat eingehen können.

Diese Voraussetzungen weisen auf gewisse Eigenschaften der Bindung hin, die nicht im Sinne chemischer Umsetzungen mittels Hauptvalenzen aufzufassen sind, sondern eine adsorptive Bindung oder eine Komplexbildung usw. wahrscheinlich machen. Zur Klärung dieser Fragen sollen die folgenden Untersuchungen beitragen. Dabei konnte sich schon aus der Ermittlung der quantitativen Bindungsverhältnisse bei steigenden Konzentrationen des Glykosids ein Hinweis ergeben. Für rein adsorptive Prozesse konnte eine Abhängigkeit im Sinne einer Adsorptionsisotherme erwartet werden. Bei chemischen Umsetzungen waren Gesetzmäßigkeiten im Sinne des Massenwirkungsgesetzes zu fordern, und für Temperatureinflüsse mußte bei chemischen Umsetzungen die van 't Hoffsche Regel Gültigkeit besitzen, während Adsorptionsvorgänge bei höheren Temperaturen gehemmt erscheinen mußten.

Ein besonderes Interesse mußte bei diesen Untersuchungen die Frage nach der Reversibilität der Bindung finden. Hier wäre ein etwaiger Unterschied im Verhalten von Glykosiden und Geninen, der den biologischen Wirkungsbedingungen der beiden Stoffe entspräche, ein wertvoller Hinweis dafür, daß die spezifische Bindung am Herzmuskel sich vielleicht auch an den Eiweißverbindungen dieses Substrats abspielen werde.

Eine weitere Aufgabe war die Ermittlung der Einflüsse des Milieus auf die Eiweißbindung der Glykoside. Calciumgehalt, p_H-Verschiebungen

[1] Haarmann, W., A. Hagemeier u. L. Lendle: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 205 (1939).

und gewisse Serumstoffe konnten möglicherweise die Bindung beeinflussen und damit wieder Parallelen zu den biologischen Wirkungsbedingungen bieten. Der Einfluß adsorptionsverdrängender Stoffe, wie Gallensäure oder Saponine, konnte für die Erkennung des etwaigen Adsorptionscharakters der Bindung von Bedeutung sein.

R. A. Hoekstra[2,3], der die Frage der Glykosideiweißbindung zuerst im größeren Zusammenhang behandelt hat, sprach sich in seinen Arbeiten schon für eine physikalische Natur der Bindung aus. Als indirekten Beweis dafür führte er eine Beobachtung an, daß ein Froschherz von einer bestimmten Digitoxineiweißlösung erst dann vergiftet würde, wenn dieser Gallenblaseninhalt oder Saponin 1 : 20000 zugesetzt wurde oder wenn das p_H der Lösung auf 8,3 gesteigert wurde. Ob Hoekstra an eine rein adsorptive Natur der Bindung gedacht hat, ist nicht eindeutig aus seinen Arbeiten zu erkennen.

Methodik.

Die Bindungsversuche wurden unter Verwendung des in einer vorausgehenden Arbeit von Haarmann, Hagemeier und Lendle[1] beschriebenen Verfahrens der Austauschdialyse ausgeführt. In der Dialysierhülse befanden sich die Albumin- oder Serumlösung mit einem gleichen Gehalt an Glykosid wie die gleichen Mengen von Außenlösung, gegen welche der Dialyseausgleich vorgenommen wurde. Die Ansätze blieben 3—4 Tage im Eisschrank stehen. Während dieser Zeit konnten sich nach Bindung des Glykosids an die Albumine ein Ausgleich der beiden Glykosidkonzentrationen bis zum Gleichgewicht einstellen. In der eiweißfreien Außenlösung erfolgt die Ermittlung der Glykosidkonzentration stufenphotometrisch (vgl. Hagemeier[4]).

Eine besondere Besprechung erfordert nur die Prüfung der Reversibilität, weil hier für die Bewertung der Ergebnisse besondere rechnerische Überlegungen notwendig waren. Wenn nach Abschluß der Austauschdialyse die weitere Dialyse gegen eine gleiche Flüssigkeitsmenge glykosidfreier Außenlösung durchgeführt wurde, dann konnte bei fester Bindung erwartet werden, daß die Außenlösung nur die halbe Konzentration des frei gelösten Glykosides in der Innenlösung, d. h. auch in der früheren Außenlösung erreichen würde. Wenn aber die gleiche Bindung an das Albumin reversibler Natur ist, dann mußte zusätzlich Glykosid frei in die Lösung treten und nach erreichtem Gleichgewicht des Austausches mußte die Konzentration in der Außenlösung über den errechneten Wert hinaussteigen. Die absolute Menge von Glykosid, die bei den Bindungsversuchen an das Albumin fixiert und bei den Lösungsversuchen wieder freigegeben wurde, ließ sich aus den Mengenverhältnissen des Versuchsansatzes berechnen und in % ausdrücken. Naturgemäß sind solche Werte nur ein relativer Ausdruck für den Grad der Reversibilität, da bei einem häufigeren Wechsel der Außenlösung die Bindung vermutlich völlig getrennt werden könnte. Für die quantitative Bestimmung wäre dabei aber die Glykosidkonzentration in der größeren Dialysatmenge zu klein geworden. Bei einigen ersten Versuchen zeigte sich bald, daß der Ausgleich in diesen Dialyseversuchen für die Reversibilitätsprüfung langsamer als bei den Bindungsversuchen erfolgte. Es wurde daher eine längere Zeit für die Dialyse gewählt (5 Tage und mehr).

[2] Hoekstra, R. A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **162**, 649 (1931). — [3] Hoekstra, R. A.: Ebenda **162**, 663 (1931). — [4] Hagemeier, A.: Ebenda **194**, 195 (1939).

I. Einflüsse des Milieus.

Es ist einleitend schon darauf hingewiesen worden, daß nach Hoekstra[3] p_H-Verschiebungen nach der alkalischen Seite die Digitoxineiweißbindung aufheben können. Hoekstra prüfte dies bei Einwirkung der Digitoxineiweißlösung am isolierten Froschherzen, bei welchem wohl durch diese unphysiologische Ionenkonzentration auch andere Veränderungen an Zellsubstrat eine Rolle spielen können (Permeabilität, Bindungsvermögen, Empfindlichkeit usw.), so daß der Nachweis einer Lösung der Digitoxineiweißbindung mit diesem indirekten Verfahren noch nicht unbedingt sichergestellt ist.

Eine weitere Frage, die uns interessierte, war die Mitwirkung von Calcium bei diesen Bindungsvorgängen. Es ist bekannt, daß Calcium auch an die Serumalbumine gebunden wird (vgl. Literatur bei Bennhold[5]). Es schien also möglich, daß dadurch vielleicht eine Bindungskonkurrenz auftreten kann. Andererseits ist aus biologischen Versuchen bekannt, daß die toxische Digitaliswirkung am Herzen bei Calciummangel der Ringerlösung in geringerem Grade erfolgt, während am calciumarm ernährten, hypodynamen Herzen Digitalis eine therapeutische Wirksamkeit besitzt. Von manchen Autoren (Loewi[6]) ist daher die Digitaliswirkung zum Teil mit einer Sensibilisierung für Calcium gleichgesetzt worden.

Die Ergebnisse der Prüfung von p_H-Änderungen und Calciumgehaltsteigerungen auf die Bindungsbedingungen der Albumine sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Pufferung erfolgte bei diesen Versuchen mittels Phosphatgemisch.

Tabelle 1.
Bindungen bei verschiedener Pufferung und bei Zusatz von Calcium. 1% Albumin (Person G.), 0,9% NaCl, 6% Alkohol.

Zusatz	Bedingungen	Vorgelegt mg%	Gebunden mg%	Zusatz	Bedingungen	Vorgelegt mg%	Gebunden mg%
Digitoxin	—	2,0	1,01 0,96	Digitoxin	$p_H = 8{,}0$	2,0	0,99 0,98
	$p_H = 6{,}0$	2,0	0,980 0,96		20 mg% $CaCl_2$	2,0	0,98 0,97
	$p_H = 7{,}36$	2,0	1,01 0,97		100 „ „	2,0	0,95 1,01

Als Ergebnis dieser Versuche kann festgestellt werden, daß die Bindungsbedingungen weder durch p_H-Verschiebungen in dem begrenzten Bereich noch durch Calciumzusätze beeinflußt werden.

[5] Bennhold: Erg. inn. Med. **42**, 273 (1932). — [6] Loewi, O.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **82**, 131 (1918).

Es wurde anschließend auch der Einfluß von Harnstoff auf die Digitaliseiweißbindung geprüft, weil neuerdings von Heim[7] die Beobachtung mitgeteilt worden ist, daß die Strophanthinbindung am isolierten Froschherzen verstärkt werde bei Gegenwart von 0,3% Harnstoff in der Ringerlösung. Als Grund für diese Erklärung einer verstärkten Strophanthinwirkung wurde angenommen, daß Harnstoff den Dispersitätsgrad der Eiweißlösung erhöhen könne. Heim[8] selbst konnte früher zeigen, daß Harnstoff die Hydratationsfähigkeit von Eiweiß erhöht, und er berichtet[9] über einige englische Arbeiten, nach welchen in Harnstofflösungen das Eiweiß seine Molekülgröße reversibel verändern kann (vgl. dazu auch Felix, Otto und Laibach, Chemie und Physiolog. des Eiweiß, Dresden 1938, S. 1). Solche Veränderungen am Eiweißmolekül treten aber wohl nur in Konzentrationen auf, welche weit oberhalb der im Organismus möglichen Konzentrationen liegen.

Unsere eigenen Versuche (Tabelle 2) mit mäßigen Konzentrationen zeigen keine Steigerung der Glykosidbindung in höheren Konzentrationen, sogar eher eine geringe Abnahme.

Tabelle 2. Einwirkung von Harnstoff auf die Bindung an Boviserin. Boviserin 1:7 verdünnt. Vorgelegt 2 mg% Glykosid.

Harnstoff %	Digitoxin gebunden in mg%	k-Strophanthin gebunden in mg%	Harnstoff %	Digitoxin gebunden in mg%	k-Strophanthin gebunden in mg%
0	0,79	0,69	1,0	0,57	—
	0,73	0,67		0,58	0,58
0,1	0,78	0,64			
	—	0,70			

In früheren Versuchen von Haarmann, Hagemeier und Lendle[1] war festgestellt worden, daß die Bindungsfähigkeit von Seren für Digitalisglykoside größer sein kann, als den darin enthaltenen Albuminmengen entspricht. Das erweckte die Vermutung, daß vielleicht im Serum noch Stoffe vorkommen können, welche die Bindungsfähigkeit der Eiweißstoffe fördernd beeinflussen. Einige Versuche mit gegen 0,9% NaCl dialysiertem Serum und mit Zusätzen des Dialysates zum dialysierten Serum sollten diese Möglichkeit experimentell prüfen. Dabei interessierte auch die Frage, wie weitgehend durch Erwärmen inaktiviertes Serum seine Bindungsfähigkeit einbüßt und durch Reaktivierung wiedergewinnen kann. Hoekstra[2] hatte nämlich darauf hingewiesen, daß bei seinen biologischen Prüfungen der Wirkung des Digitoxineiweißkomplexes am Froschherzen das inaktivierte Serum seine Entgiftungsfähigkeit verloren hatte.

[7] Heim: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 581 (1939). — [8] Heim: Biochem. Z. **291**, 88 (1937). — [9] Heim: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 276 (1939).

Tabelle 3. Bindungen an natives und dialysiertes Serum (Person P.). Zusammensetzung des Serums: Gesamteiweiß 7,65%, Euglobulin 0,65%, Pseudoglobulin 1,48%, Albumine 5,52%. Serum gegen Ringer dialysiert und auf das Fünffache mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Natives Serum ebenso verdünnt.

Zusatz	Natives Serum		Dialysiertes Serum	
	1 mg% gebunden mg%	2 mg% gebunden mg%	1 mg% gebunden mg%	2 mg% gebunden mg%
Digitoxin	0,99	1,52	0,35	0,58
	0,99	1,50	0,41	0,66
Digitoxigenin	0,67	1,13	0,47	0,93
	0,610	1,14	0,49	0,91

Eine erste Versuchsreihe, deren Ergebnisse in Tabelle 3 zusammengestellt sind, zeigte anscheinend, daß das Serum durch die Dialyse gegen 0,9% NaCl-Lösung an Bindungsfähigkeit für Digitoxin und sein Genin erheblich verlieren kann. Es bindet nur noch etwa 40% der von dem nativen Serum gebundenen Glykosidmengen.

In einer zweiten Versuchsreihe, in der gleichzeitig auch der Einfluß des Zusatzes des gewonnenen Dialysates geprüft wurde, konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden. Bei dem Versuchsansatz wurde das Dialysat dem dialysierten Serum zugesetzt und dieses Gemisch dann erst auf die gleiche Verdünnung gebracht wie das native Serum und das dialysierte Serum, so daß gleiche Bedingungen bestanden.

Tabelle 4. Bindung an natives Serum, dialysiertes Serum und bei Zusatz des Dialysates.

Serum (Person G.): Gesamteiweiß 7,75%, Euglobulin 0,66%, Pseudoglobulin 1,82%, Albumin 5,27%. Verdünnung des Serums 1 : 10. Vorgelegte Digitoxinkonzentration 2 mg%.

Zusatz	Natives Serum	Dialysiertes Serum	Dialysiertes Serum + Dialysat
	gebundene Mengen von Digitoxin in mg%		
Digitoxin	0,97	0,75	0,72
	0,93	0,73	0,74
Digitoxigenin	1,13	1,14	0,82
	1,09	0,87	0,82

Tabelle 4 bringt die Ergebnisse dieser Versuche. Es geht daraus hervor, daß das Serum an seiner Bindungsfähigkeit durch die Dialyse nicht wesentlich einbüßt und daß durch Zusatz des Dialysates die Bindungsfähigkeit nicht erhöht werden kann. Der Grund für diese Abweichung von den Ergebnissen des vorausgehenden Versuchs dürfte in folgenden Unterschieden der Versuchsbedingungen zu finden sein: Im ersten Versuch (Tabelle 3) war das native Serum sofort

auf seine Bindungsfähigkeit geprüft worden und das dialysierte Serum erst nach Abschluß einer 5—6tägigen Dialyse. Im zweiten Versuch (Tabelle 4) war das native Serum aber neben dem zu dialysierenden Serum bis zum Abschluß der Dialyse aufbewahrt worden, und die Prüfung der drei Serumansätze erfolgte gleichzeitig. Es bestand hier also kein Alterungsunterschied von 5—6 Tagen für die geprüften Serumproben.

Nach diesen Befunden kann also den dialysierbaren Bestandteilen des Serums keine bindungsfördernde Eigenschaft zugeschrieben werden, und die früher ermittelten höheren Bindungswerte des nativen Serumalbumins im Vergleich zu der Bindungsfähigkeit der gereinigten Albuminfraktion aus Serum erklärt sich vielleicht aus gewissen Denaturierungsmöglichkeiten bei diesem Reinigungsprozeß.

Zwei weitere Versuchsreihen beschäftigten sich mit der Frage nach dem Einfluß der Inaktivierung (Tabelle 5). Es wurden Serumproben vom Kaninchen und vom Pferd je 30 Minuten bei 60° erhitzt und dann 10fach verdünnt. Die Prüfung der Bindungsfähigkeit der inaktivierten und des nativen Serums erfolgte gleichzeitig, so daß keine Alterungserscheinungen Ursache für die vorliegende Abweichung sein können. Das inaktivierte Serum wurde ferner noch durch Zusätze von $^1/_{10}$ der Menge des inaktivierten Serums an Frischserum reaktiviert und gleichzeitig auf Bindungsfähigkeit geprüft.

Tabelle 5. Bindungen an natives, inaktiviertes und reaktiviertes Serum. (Vorgelegt 2 mg%.)

Zusatz	Nativ	Inaktiviert	Reaktiviert
1. Kaninchenserum (10fach verdünnt). Zusammensetzung des Serums: Gesamteiweiß 6,40 %, Euglobulin 0,79 %, Paraglobulin 0,91 %, Albumin 4,70 %.			
Digitoxin	1,334	0,000	1,025
Digitoxigenin	1,172	0,760	1,020
2. Pferdeserum (10fach verdünnt). Zusammensetzung des Serums: Gesamteiweiß 5,60 %, Euglobulin 0,57 %, Pseudoglobulin 2,67 %, Albumin 2,36 %.			
Digitoxin	0,876	0,072	0,700
Digitoxigenin	0,970	0,568	0,913

Die in Tabelle 5 zusammengestellten Ergebnisse zeigen die auffallende Tatsache, daß das inaktivierte Serum seine Bindungsfähigkeit für das Glykosid praktisch völlig verloren hat und sie durch die Reaktivierung wiedergewinnt, während es die Bindungsfähigkeit für das Genin nur partiell verliert, aber auch entsprechend bei der Reaktivierung wiedergewinnt. Diese Befunde bestätigen die Beobachtungen von Hoekstra bei biologischer Auswertung am Froschherzen. Reaktivierungsversuche scheint er aber nicht ausgeführt zu haben.

Eine Deutung für dieses Verhalten des Serums ist auf Grund der geringen bisherigen Kenntnisse über die chemischen Grundlagen der Bindungsreaktionen nicht zu geben. Die Beobachtungen stellen aber eine einfachere Parallele mit definiertem Wirkstoff zu den bekannten Erfahrungen aus der Serologie mit unbekannten höhermolekularen Wirkstoffen dar.

II. Zur Frage des adsorptiven Charakters der Bindung.

Es ist einleitend darauf hingewiesen worden, daß aus den quantitativen Verhältnissen der Glykosidbindung an das Serumeiweiß bei Einwirkung verschiedener Konzentrationen, bei verschiedener Temperatur und bei Anwesenheit von adsorptionsverdrängenden Stoffen eine adsorptive Grundlage der Bindung leicht erkannt werden könnte. Diese drei Möglichkeiten der Prüfung wurden hier berücksichtigt.

A. Glykosidbindung aus verschiedenen Konzentrationen.

Für die Prüfung war es wünschenswert, die Versuche über möglichst große Konzentrationsbereiche durchzuführen. Dafür war es aber notwendig, die Untersuchungen mit einem wasserlöslichen Glykosid auszuführen, weil sonst der Zusatz der erforderlichen Alkoholkonzentrationen die Bindungsfähigkeit stark beeinträchtigt hätte (vgl. die entsprechenden Kontrollversuche bei Haarmann, Hagemeier und Lendle[1]). Wir verwendeten bei unseren Versuchen daher k- und g-Strophanthin in Konzentrationen von 0,5 bis 10 mg%, wobei die Konzentrationen immer in geometrischer Reihe anstiegen. Die Eiweißkonzentrationen waren in allen Ansätzen die gleichen. Bei den hohen Glykosidkonzentrationen mußten die auf ihren Glykosidgehalt zu prüfenden Lösungen entsprechend für die kolorimetrische Bestimmung verdünnt werden.

Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen sind in Tabelle 6 und 7 zusammengestellt. Es ist darin für die einzelnen Konzentrationen jeweils in der letzten Spalte angegeben, wieviel Prozent der vorgelegten Konzentration zur Bindung kam. Die Befunde zeigen, daß die Bindung aus niedrigeren Konzentrationen nicht relativ größer sind als aus den höheren Konzentrationen, wie es den Gesetzen einer adsorptiven Bindung entsprochen hätte. Andererseits ist die Bindung auch nicht in allen Konzentrationsbereichen prozentual gleich groß, vielmehr steigt die Bindungsgröße in Prozent offensichtlich mit zunehmenden Konzentrationen, was besonders deutlich aus Tabelle 7 im Sinne einer stetigen Kurve erkennbar wird. Man könnte daraus sogar einen etwaigen Faktor von 1,4 berechnen, um welchen die Bindungsprozente anzusteigen scheinen. Die Ergebnisse sollen aber nicht so weitgehend mathematisch ausgewertet werden. Es genügt für unsere Fragestellung zunächst die Feststellung, daß die Bindung nicht den Adsorptionsgesetzen zu gehorchen scheint

Tabelle 6.

Bindung von k-Strophanthin aus verschiedenen Konzentrationen. Wässerige Lösung. Boviserin 1 : 7 verdünnt (= 0,3% Albumin).

Vorgelegt mg%	Gefunden mg%	Gebunden mg%	Bindung %	Vorgelegt mg%	Gefunden mg%	Gebunden mg%	Bindung %
1,0	0,823	0,177	18	8,0	5,65	2,35	30
	(0,957)	(0,043)			5,62	2,38	
2,0	1,625	0,375	18,4	16,0	10,01	5,99	37
	1,638	0,362			10,02	5,98	
4,0	3,246	0,745	14–18,6				
	3,445	0,555					

Tabelle 7.

Bindung von g-Strophanthin aus verschiedenen Konzentrationen. Wässerige Lösung. Serum (Person G.) 1 : 10 verdünnt (= 0,53% Albumin).

Vorgelegt mg%	Gefunden mg%	Gebunden mg%	Bindung %	Vorgelegt mg%	Gefunden mg%	Gebunden mg%	Bindung %
0,5	0,461	0,039	6,0	4,0	3,354	0,646	16,0
	0,478	0,022			3,352	0,648	
1,0	0,921	0,079	8,6	8,0	6,155	1,845	23,0
	0,908	0,092			6,170	1,830	
2,0	1,718	0,282	13,4				
	1,748	0,252					

und in niedrigeren Konzentrationen sogar relativ geringer ist. Diese Beobachtung kann wohl nur so erklärt werden, daß die Bindung einen reversiblen Charakter trägt und daß erst bei höheren Glykosidkonzentrationen das Gleichgewicht der Reaktion mehr nach der Seite der Komplexbindung verschoben wird.

B. Einfluß der Temperatur auf die Bindungsgröße.

Es wurden Versuchsreihen mit Digitoxin und seinem Genin bei 38° (Brutschrank) und bei tieferen Temperaturen im Eisschrank angesetzt. Bei den Brutschrankversuchen mußte zur Verhütung des Wasserverlustes durch Verdunsten und zur Verhütung des Verlustes an Toluol, welches den Eiweißlösungen als Konservierungsmittel zugesetzt war, über den Proben eine wasserdampf- und toluolgesättigte Atmosphäre gehalten werden durch Überdecken mit einer großen Glasglocke, unter welcher Wasser und Toluol aufbewahrt wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Die Befunde lassen keinen Unterschied der Glykosid- und Geninbindung bei so stark voneinander abweichenden Temperaturbedingungen erkennen. Wenn eine chemische Umsetzung Trägerin der Bindung wäre,

Tabelle 8. Bindung bei verschiedenen Temperaturen. Albumin, 1% (Person G.).

Zusatz	Temperatur	Vorgelegt 1 mg% gebunden mg%	Vorgelegt 2 mg% gebunden mg%
Digitoxin	Eisschrank	0,51	1,01
	„	0,54	0,96
	38°	0,50	1,00
	38°	0,57	1,01
Digitoxigenin	Eisschrank	0,42	0,86
	„	0,43	0,87
	38°	0,40	0.89
	33°	0,39	0,89

dann müßte bei der höheren Temperatur nach der van 't Hoffschen Regel etwa die 3—4fache Bindung erfolgt sein.

H. Fischer[10] hatte früher in Versuchen am isolierten Froschherzen bei Einwirkung von Digitoxin unter verschiedenen Temperaturbedingungen eine Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Temperatur nachgewiesen. Die verstärkte Wirkung bei höherer Temperatur muß dabei aber wohl nicht allein aus einer erhöhten chemischen Bindung von Digitoxin nach der R. G. T.-Regel von van 't Hoff erklärt werden. Die Bindung selbst wurde ja auch gar nicht gemessen, etwa im Passageversuch. Es kann auch mit der Temperatursteigerung eine Erhöhung der Giftempfindlichkeit verbunden sein, ohne daß die Bindungsgröße dabei zunimmt. Unsere Ergebnisse sprechen jedenfalls im Hinblick auf die Eiweißverbindungen nicht für eine solche Beziehung.

C. Einfluß adsorptionsverdrängender Mittel.

In einer vorausgehenden Mitteilung von Korfmacher[11], in welcher die Bedingungen der adsorptiven Bindung von Digitalisglykosiden an verschiedenen anorganischen Adsorbentien geprüft worden waren, konnte auch die Adsorptionsverdrängung durch Galle und gallensaure Salze dargestellt werden. Mit Konzentrationen von 0,01—0,1% waren dabei deutliche Verdrängungen erkennbar.

Ähnliche Versuche wurden hier für die Eiweißbindung ausgeführt bei Verwendung der Austauschdialyse. Es wurden dabei Fel. tauri depurat. sicc. Merck oder das reine desoxycholsaure Natrium benutzt. In einigen Versuchen wurde das Gallepräparat auch vor dem Ansatz der Versuche dialysiert. Durch Kontrollversuche wurde der kolorimetrische Leerwert des Gallenpräparats bei solchen Dialyseversuchen ermittelt und bei der Bewertung im Adsorptionsversuch in Abzug gebracht. Die Gallensäuren selbst geben mit Pikrinsäure keine positive Baljetsche Reaktion, so daß keine Leerwertbestimmungen notwendig waren.

[10] Fischer, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **135**, 39 (1928). — [11] Korfmacher: Ebenda **194**, 217 (1939).

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 9 und 10 zusammengefaßt. Aus diesen Befunden kann keine verdrängende Wirkung der Galle oder des gallensauren Salzes abgelesen werden, selbst bei Einwirkung sehr hoher Konzentrationen. Auch die Prüfung mit der dialysierten Galle ergab in Konzentrationen bis 0,2% keine Verdrängung von Digitoxin und Strophanthin aus ihrer Eiweißbindung.

Tabelle 9.
Einwirkung von Desoxycholsäure auf die Glykosidbindung an Serum.
Boviserin 1 : 7 verdünnt (= 0,3% Albumin). Vorgelegt 2 mg% Glykosid.

Desoxycholsaures Natrium%	Digitoxin gebunden in mg%	Strophanthin gebunden in mg%	Desoxycholsaures Natrium%	Digitoxin gebunden in mg%	Strophanthin gebunden in mg%
—	0,79	0,69	0,01	0,75	0,75
	0,73	0,67		0,79	0,72
0,001	0,75	0,70	0,1	0,72	0,72
	0,76	(0,58)		0,82	0,61

Tabelle 10. Einwirkung von Galle auf die Bindung an Boviserin.
Boviserin 1 : 7 verdünnt. Vorgelegt 2 mg% Digitoxin.

Galle %	Gebundenes Digitoxin mg%	Galle %	Gebundenes Digitoxin mg%
—	0,63	0,01	0,67
	0,64		0,66
0,001	0,66	0,1	0,64
	0,66		0,72

Tabelle 11.
Einwirkung von Digitonin auf die Digitoxinbindung an Serum.

Versuch I Serum von Person G. 1 : 10 verdünnt (= 0,53 %) Digitoxin vorgelegt 2 mg%		Versuch II Kaninchenserum 1 : 10 verdünnt Digitoxin vorgelegt 2 mg%	
Digitonin	Gebundenes Digitoxin in mg%	Digitonin	Gebundenes Digitoxin in mg%
—	0,97	—	0,82
	0,93		0,77
			0,75
1/50 000	0,89	1/50 000	0,57
			0,57
			0,48
1/15 000	0,88	1/15 000	0,72
	0,94		0,74
			0,76
1/5 000	0,84	1/5 000	0,66
	0,83		0,65
			0,63

Weitere Versuche wurden mit dem Saponin-Präparat Digitonin Merck ausgeführt (Tabelle 11). Auch diese Versuche zeigten keine Adsorptionsverdrängung der Glykoside.

III. Reversibilität der Bindung.

Die Bedeutung der Reversibilität der Glykosid-Eiweißbindung ist einleitend erwähnt worden. Der Abschnitt „Methodik" enthält die Angaben über den Ansatz der Versuche zur Reversibilitätsprüfung und über die rechnerische Bewertung der Befunde (vgl. S. 230). Für die Prüfung der Reversibilität dienten die Ansätze von Bindungsversuchen, über welche schon im vorausgehenden berichtet worden ist. Der Grad der Reversibilität konnte dabei in Prozent der stattgefundenen Bindung angegeben werden.

A. Reversibilität der Strophanthinbindung.

Es wurden die Versuche von Tabelle 6 und 7 hier verwendet. Nach 5tägigem Stehen der Dialysierhülsen in der erneuerten Außenlösung wurde deren Glykosidgehalt ermittelt. Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen sind in Tabelle 12 und 13 zusammengefaßt. Es geht daraus hervor, daß die beiden Strophanthine durchaus reversibel gebunden werden. Die „freigewordenen" Konzentrationen steigen in absoluten Zahlen, bei Berechnung der Reversibilität in Prozent der gebundenen Glykosidmengen zeigt sich allerdings eine erheblich geringere Reversibilität in den Versuchen mit höherer Bindung. Dieser Unterschied ist besonders deutlich bei dem k-Strophanthin, von dem allerdings auch wesentlich größere Mengen gebunden worden waren. Aus den Ansätzen mit niedriger Bindung war bei beiden Strophanthinen praktisch alles wieder frei geworden. Dieses Nachlassen der Reversibilität für die höheren Bindungsgrade ist vielleicht daraus zu erklären, daß die Zeit für den Ausgleich bei der Dialyse hier zu gering war. Nach unseren Erfahrungen benötigen die Versuche der Reversibilitätsdialyse jedenfalls eine längere Zeit als die Bindungsversuche (s. unten).

Tabelle 12. Reversibilität der k-Strophanthinbindung.
Boviserin 1 : 7 verdünnt.

Nach Bindungsausgleich		Nach Reversibilitätsausgleich		
gebunden mg%	freie Konzentration mg%	gefundene Konzentration mg%	frei geworden mg%	Reversibilität %
0,177	0,823	0,577	0,165	93
0,375	1,625	1,112	0,299	80
0,362	1,638	0,912	0,093	25
0,745	3,246	1,595	—	—
0,555	3,445	1,605	—	—
2,35	5,65	3,098	0,273	11
2,38	5,62	2,998	0,188	8
5,99	10,01	5,448	0,443	7,4

Tabelle 13. Reversibilität der g-Strophanthinbindung.
Serum (Person G.) 1 : 10 verdünnt.

Nach Bindungsausgleich		Nach Reversibilitätsausgleich		
gebunden mg%	freie Konzentration mg%	gefundene Konzentration mg%	frei geworden mg%	Reversibilität %
0,039	0,461	0,263	0,031	100
0,022	0,478	0,277	0,038	
0,079	0,921	0,512	0,050	58
0,092	0,908	0,501	0,047	
0,282	1,718	0,936	0,077	30
0,252	1,748	0,958	0,084	
0,646	3,354	1,92	0,243	37
0,648	3,352	1,92	0,244	
1,845	6,155	3,84	0,762	42
1,830	6,170	3,85	0,767	

B. Reversibilität von Digitoxin und Digitoxigenin.

Es wurden hier zunächst die Versuche von Tabelle 4 verwendet, wo die Prüfung der Bindung an natives Serum, an dialysiertes Serum und bei Zusatz von Serumdialysat durchgeführt worden war. Die Ergebnisse dieser Versuche sind allerdings nur beschränkt zu verwerten, weil hier die Dialyse schon nach 3 Tagen abgebrochen wurde. Es waren dabei die in der Außenlösung gefundenen Konzentrationen vielfach noch kleiner als die halbe Glykosidkonzentration, welche vorher in der Innenlösung geherrscht hatte. Die „freigewordene" Konzentration war also noch negativ. Immerhin zeigen diese ersten Versuche doch schon einige Unterschiede in der Reversibilität von Digitoxin und seinem Genin. Von dem Glykosid war praktisch noch nichts frei geworden. Von dem Genin waren dagegen 13,4—27,5% abgelöst worden.

Bei weiteren Versuchen wurden die Ansätze zum Zwecke der Reversibilitätsprüfung längere Zeit im Eisschrank gehalten, bis der Ausgleich erfolgt war. Die Ergebnisse dieser Versuche (Tabelle 14) lassen für das

Tabelle 14.
Reversibilität der Digitoxin- bzw. Digitoxigeninbindung.
Serum (Kaninchen) 1 : 10 verdünnt.

	Nach Bindungsausgleich		Nach Reversibilitätsausgleich		
	gebunden mg%	freie Konzentration mg%	gefundene Konzentration mg%	frei geworden mg%	Reversibilität %
Digitoxin	0,774	1,226	0,636	0,023	3
	0,822	1,178	0,595	0,006	1
	0,745	1,225	0,604	0,008	0
Digitoxigenin	0,482	1,518	0,845	0,086	18
	0,535	1,465	—	—	—
	0,579	1,421	0,820	0,110	19

Digitoxin praktisch keine Reversibilität erkennen, während das Digitoxigenin zu etwa 18% wieder abgelöst worden war.

Nach diesen Befunden mit Strophanthin, Digitoxin und Digitoxigenin besteht also eine deutliche Parallele der Reversibilitätsbedingungen zu den praktischen Erfahrungen über die Auswaschbarkeit und Eliminationsfähigkeit dieser Stoffe am biologischen Substrat.

IV. Geschwindigkeit der Bindung der Glykoside an Serumeiweiß.

Bei der Prüfung der Adsorptionsgeschwindigkeit an anorganischen Adsorbentien hatte Korfmacher [11] in einer vorausgehenden Arbeit zeigen können, daß das Digitoxin schneller gebunden wird als Strophanthin. Leider ließ sich nun in unseren Versuchen mit der Ausgleichsdialyse dieser Faktor der Bindungsgeschwindigkeit nicht prüfen. Wir versuchten es daher in einer anderen Weise, indem wir durch Zusatz von Trichloressigsäure zu der Eiweißglykosidlösung den Eiweißkomplex fällten und im neutralisierten Filtrat die verbliebenen Glykosidkonzentrationen kolorimetrisch ermittelten. Die Trichloressigsäure störte nach Kontrollversuchen die Baljetsche Reaktion nicht.

Bei diesen Versuchen war natürlich mit der Fehlermöglichkeit zu rechnen, daß durch das Fällungsreagens die Bindung an das Eiweiß zerrissen werden konnte und andererseits, daß durch das gefällte Eiweiß auch rein adsorptiv an der Oberfläche die Glykoside gebunden werden konnten. Die letzte Möglichkeit ließ sich in Kontrollversuchen prüfen, indem die Serumfällung vor dem Glykosidzusatz vorgenommen wurde und die Abfiltration erst in verschiedenen zeitlichen Abständen erfolgte. Tabelle 15 bringt die Ergebnisse eines solchen Versuchs.

Tabelle 15.

10 ccm Boviserin mit Trichloressigsäurezusatz gefällt und mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 100 ccm aufgefüllt. Zu je 8 ccm dieser Suspension wurden 2 mg% Strophanthin oder Digitoxin unter Verdünnung des Ansatzes bis auf 10 ccm gegeben. Filtration erfolgte nach verschiedenen Zeiten.

Filtration	Digitoxin gebunden in mg%	Strophantin gebunden in mg%	Filtration	Digitoxin gebunden in mg%	Strophantin gebunden in mg%
sofort	1,03	0,25	nach 40 Minuten	1,29	0,76
	1,07	0,27		1,43	0,74
nach 5 Minuten	1,16	0,45	„ 80 „	1,42	1,09
	1,32	0,45		1,55	0,81
„ 10 „	1,32	0,33	„ 160 „	1,56	1,25
	1,45	0,52		1,56	–
„ 20 „	1,29	0,72			
	1,50	0,66			

Diese Vorversuche zeigen, daß die adsorptive Bindung des Digitoxins viel schneller verläuft als die des Strophanthins. In

5—10 Minuten wurde die Digitoxinbindung schon praktisch abgeschlossen, während die Strophanthinbindung in 5—10 Minuten erst etwa 30% der Bindungsmöglichkeit erreicht hatte.

Nunmehr wurde in neuen Versuchen die Serumeiweißfällung mit Trichloressigsäure erst vorgenommen, nachdem das Eiweiß eine Zeitlang mit dem Glykosid gestanden hatte. Die Filtration wurde sofort nach der Fällung ausgeführt, damit die nachträgliche Adsorption nicht mehr viel Zeit gewinnen konnte. Ganz ausschließen ließ sie sich nicht, sie dürfte bei dem Strophanthin aber jedenfalls verhältnismäßig gering sein.

Tabellen 16 und 17 bringen einige derartige Versuchsbeispiele.

Tabelle 16.

12 ccm Kaninchenserum mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 200 ccm aufgefüllt. Je 4,8 ccm davon mit Strophanthin oder Digitoxinzusatz (2 mg%) auf 6 ccm ergänzt. Fällung mit 1 ccm 25%iger Trichloressigsäure. 5 ccm Filtrat mit 0,55 ccm 10%iger NaOH neutralisiert.

Einwirkungszeit vor der Ausfällung	Digitoxin gebunden in mg%	k-Strophanthin gebunden in mg%	Einwirkungszeit vor der Ausfällung	Digitoxin gebunden in mg%	k-Strophanthin gebunden in mg%
0 Minuten	1,160	0,310	30 Minuten	1,148	0,480
0 Minuten	1,145	0,270	60 „	1,180	0,560
15 „	1,275	0,480	120 „	1,260	0,605

Tabelle 17.

Versuchsanordnung wie Tabelle 16. Menschenblutserum.

Einwirkungszeit vor der Ausfällung	Digitoxin gebunden in mg%	k-Strophanthin gebunden in mg%	Einwirkungszeit vor der Ausfällung	Digitoxin gebunden in mg%	k-Strophanthin gebunden in mg%
0 Minuten	0,675	0,145	20 Minuten	0,855	0,235
5 „	0,891	0,165	40 „	0,855	0,360
10 „	0,891	0,255			

Diese Befunde lassen klar erkennen, daß die Digitoxinbindung an das Eiweiß schon in den ersten Minuten abgeschlossen ist. Der Fehler der nachträglichen Adsorption an den Niederschlag steckt zwar in dem Bindungswert, er dürfte aber wegen der gleichmäßigen Arbeitsweise und schnellen Adsorption des Digitoxins etwa gleich groß sein. Für das Strophanthin ist die Bindungsgeschwindigkeit wesentlich geringer. Hier sind in 5 Minuten nur etwa 50% von der möglichen zu bindenden Menge verankert. Die Versuche lassen auch deutlich die ansteigenden Werte bei längerer Bindungszeit vor Unterbrechung durch die Trichloressigsäurefällung erkennen.

Erörterung der Befunde.

Die in dieser Untersuchung erhobenen Befunde sollen nach zwei Richtungen erörtert werden. Es kann die Frage gestellt werden, welche Möglichkeiten einer chemischen Bindung im Gewebe sich daraus ableiten lassen und wie sich bei der Digitalisverteilung in vivo diese Bindungsvorgänge geltend machen können.

Für die Eiweißbindung der Glykoside kann mit großer Wahrscheinlichkeit eine Bindung durch Hauptvalenzen ausgeschlossen werden. Es handelt sich hier um mehr oder weniger reversible Reaktionen, die erst bei steigenden Konzentrationen von Glykosiden nachweisbar werden. Es dürften sich hier Bindungen an Nebenvalenzen des Eiweißes abspielen, wie sie auch für andere Pharmaca bekannt sind und wie sie bei der großen Fähigkeit der Eiweißmoleküle zur Komplexbildung verständlich sind. Nach Felix [12] sind als Träger solcher Reaktionen die freien Gruppen der mehrwertigen Aminosäuren im Eiweißmolekül zu betrachten. Es kann dabei wohl ausgeschlossen werden, daß es sich um etwaige Salzbildungen mittels der Carboxyl- oder der basischen NH_2-Gruppe der Aminosäuren handelt. Vielleicht spielen die alkoholischen OH-Gruppen einiger Aminosäuren eine besondere Rolle.

Es kann auch noch nicht erklärt werden, warum die Albumine den anderen Serum-Eiweißfraktionen gegenüber eine Vorzugsstellung einnehmen. Als wesentliche Unterschiede in der Zusammensetzung von Albuminen und Globulinen werden folgende Punkte betrachtet: Der Schwefelgehalt ist bei Serumalbumin doppelt so hoch wie bei Serumglobulin. Der Tryptophangehalt ist dagegen bei dem Globulin fünffach so groß wie bei dem Albumin. Das Serumalbumin enthält mehr Diamino-N und weniger Mono- und Nichtamino-N als das Serumglobulin.

Die Frage nach der rein adsorptiven Bindung der Glykoside an das große Eiweißmolekül konnte verneint werden. Es wäre an sich schon unverständlich, warum dann die Albumine sich den anderen Fraktionen gegenüber so auszeichnen sollten, deren Molekülgröße nicht so grundsätzlich verschieden ist. Besondere Versuche mit steigenden Konzentrationen bei verschiedenen Temperaturen und bei Zusatz von adsorptionsverdrängenden Stoffen hatten keine Gesetzmäßigkeit erkennen lassen, die für rein adsorptive Bindungsvorgänge an das Eiweiß sprachen.

Vom Bau der Digitalisglykoside aus gesehen, waren auch gewisse Bindungsmöglichkeiten zu erwarten. Diese Stoffe gelten als saponinartige Verbindungen, deren Kapillaraktivität aber nicht besonders groß ist (Schmelzer [13], Clark [14]). Für die Saponine, z. B. Digitonin ist die

---

[12] Otto, Felix u. Laibach: Chemie und Physiologie des Eiweiß. Dresden 1938, S. 1. — [13] Schmelzer, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **177**, 614 (1935). — [14] Clark, A. J.: J. Pharmacol. (Am.) **5**, 215 (1914).

Fähigkeit der Additionsverbindung mit Cholesterin von Windaus[15] und Ponder[16] beschrieben worden. Es handelt sich dabei um eine Molekülverbindung 1 : 1. Ähnliche Additionsverbindungen liefern auch andere Alkohole (Tschesche[17]). Auch für die Digitalisglykoside unter sich ist von Cloetta[18] angenommen worden, daß sie sich aneinander lagern können und dabei im Gemisch leichter löslich sind als die reinsten Glykosidpräparate.

Die Digitalisglykoside zeigen dem Cholesterin gegenüber aber schon gewisse Unterschiede des Verhaltens. Es scheint hier keine festere Bindung einzutreten. Digitalisglykoside werden praktisch nicht an die cholesterinreichen Erythrocyten gebunden wie das Saponin, sie wirken auch nicht hämolytisch. Andererseits kann eine Digitaliswirkung am Froschherzen auch durch Cholesterinzusatz zur Lösung nicht gehemmt werden (Karaulow[19], Hoekstra[20]).

Die chemische Struktur der Digitalisglykoside bietet wohl überhaupt wenig Möglichkeiten für eine chemische Reaktion, das hydrophobe Sterinskelet wohl am wenigsten. Die verschiedenen alkoholischen OH-Gruppen wären vielleicht in erster Linie zu berücksichtigen für irgendwelche Bindungen im Sinne von Molekülverbindungen. Dabei kann aber die sekundäre OH-Gruppe am C_3 wohl bestimmt ausgeschlossen werden, weil das Digitoxin selbst besser gebunden wird als sein Genin, an dessen entsprechender OH-Gruppe die glykosidische Bindung mit der Digitoxose erfolgt. Die Aldehydgruppe des Strophanthins kommt auch nicht in Frage, weil dieses Glykosid ja weniger gebunden wird als andere Glykoside ohne diese Aldehydgruppe.

Am nächstliegenden wäre vielleicht die Annahme, daß die Digitalisbindung mit Hilfe der spezifischen ungesättigten Lactongruppe erfolgt. Hier ist jedenfalls die reaktionsfähigste Stelle des Moleküls zu sehen. Die Tatsache, daß die Eiweißbindung aber so locker ist und daß sonstige chemische Eingriffe, welche die Lactongruppe treffen, die Wirkung des Moleküls irreversibel beeinträchtigen, macht die Annahme unwahrscheinlich, daß die Verankerung am Eiweiß auf diesem Wege erfolgt. Wir konnten dieser Frage leider bisher nicht experimentell nachgehen, weil die übliche Methode des Nachweises der Lactongruppe mittels des Legal-Testes zu unempfindlich ist und weil die sehr flüchtige Farbreaktion sich nicht für quantitative kolorimetrische Bestimmungen eignet. Die von uns verwendete Baljet-Reaktion, welche auch die spezifische Lactongruppe kennzeichnet, war nicht zu verwenden, weil die Pikrinsäure mit dem Eiweiß eine Fällung erzeugt hätte.

[15] Windaus, Z. physiol. Chem. **150**, 205 (1925). — [16] Ponder: Proc. Roy. Soc. **110**, 1 (1932). — [17] Tschesche: Erg. Physiol. **38**, 31 (1936). — [18] Cloetta, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **112**, 261 (1926). — [19] Karaulow: Biochem. Z. **32**, 145 (1911). — [20] Hoekstra, R. A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **162**, 649 (1931).

Zusammenfassend muß also gesagt werden, daß der Mechanismus dieser Bindung von Glykosiden und Eiweiß noch nicht erklärt werden kann, daß es sich dabei vermutlich um reversible Komplexbindungen, vielleicht über die OH-Gruppen des Moleküls handelt.

Die Frage der biologischen Bedeutung dieser Bindung für die Wirkungsbedingungen der Glykoside in vivo ist schon einmal in einer vorausgehenden Arbeit erörtert worden. Dabei ist darauf hingewiesen worden, daß die geringen Glykosidmengen im Organismus nach der Zufuhr von dem Serumeiweiß restlos gebunden werden können. Die Reversibilität dieser Bindung wäre aber die Voraussetzung dafür, daß die Glykoside überhaupt im Herzen und im extracardialen Gewebe noch zur Einwirkung gelangen können. Diese Reversibilität der Eiweißbindung konnte hier nachgewiesen werden. Andererseits konnte hier auch gezeigt werden, daß für diese Bindungsvorgänge eine gewisse Zeit erforderlich ist. Dabei ergaben sich für Digitoxin und Strophanthin bedeutenden Unterschiede. Digitoxin war schneller an das Eiweiß gebunden und langsamer aus dieser Bindung wieder freigegeben als das Strophanthin. Aus diesem Verhalten erklärt sich wohl auch der Unterschied der Wirkungsweise der beiden Glykoside in vivo. Digitoxin wirkt viel später auch nach intravenöser Injektion als das Strophanthin. Man hat das oft als größere „Latenz" bezeichnet. Es kann dafür nun vielleicht folgende Erklärung gegeben werden: Digitoxin wird vorübergehend am Serumeiweiß festgehalten, ehe der Herzmuskel sich damit anreichert. Beim Strophanthin dagegen wird diese Zwischenbindung an das Serumeiweiß eine geringere Rolle spielen, es wirkt daher schneller.

Bisher hat man meist eine schnellere Bindungsgeschwindigkeit von Strophanthin an Substrat angenommen. Dagegen sprechen aber unsere Erfahrungen über eine geringere Adsorptionsgeschwindigkeit in dieser Arbeit und in einer vorausgehenden Arbeit von Korfmacher[11], sowie die Erfahrungen über die geringere Bindungsgeschwindigkeit an die Eiweißkörper (vgl. S. 242). Wenn man am isolierten Herzen von Kalt- und Warmblüter, welches mit eiweißfreier Nährlösung gefüllt ist, äqui-effektive Konzentrationen von Strophanthin oder Digitoxin einwirken läßt, dann beobachtet man auch keine zeitlichen Wirkungsunterschiede mehr zugunsten des Strophanthins.

Weese[21] hat für die Verteilung der Digitalisglykoside in vivo bekanntlich eine „momentane" Bindung angenommen. Unsere Erfahrungen über Adsorptions- und Bindungsgeschwindigkeit der Glykoside bestätigen dies nicht. Auf weitere Überlegungen in diesem Zusammenhang soll hier nicht eingegangen werden.

Es muß nun noch die wichtige Frage berührt werden, ob die Digitalis-Eiweißbindung vielleicht den spezifischen Angriffspunkt der Digitalis-

[21] Weese, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **135**, 228 (1928); **141**, 329 (1929).

wirkung kennzeichnet. Es muß da zunächst an eine kritische rechnerische Überlegung erinnert werden, die wir früher [1] anstellten. Nach unseren Bindungsversuchen kann 1 g Albumin mehr als 10 mg Glykosid binden, während bei Durchströmungsversuchen von Genuit und Eschbach [22] am isolierten Meerschweinchenherzen in 1–2 Stunden nur 2–3 γ pro g Herz maximal gebunden wurden. Es ist daher schon die Auffassung ausgesprochen worden, daß bei Versuchen am Organ die Digitalisbindung vielleicht gar nicht am Zelleiweiß stattfindet, sondern nur am Eiweiß der Zellmembran. Es könnte dann die Digitaliswirkung auch eher als Membraneffekt betrachtet werden.

Darüber, ob die Glykosidbindung an das Eiweiß des Herzmuskels irgendwelche physikalisch-chemischen Zustandsänderungen oder stoffwechselchemische Reaktionen auslösen kann, soll noch keine Aussage gemacht werden. Es ist nichts darüber bekannt, ob diese Bindung das spezifische Substrat der Wirkung betrifft. Dagegen möchten wir annehmen, daß auf Grund der mengenmäßigen Reaktionsmöglichkeiten die Eiweißbindung*, auch im Gewebe, der Grund einer mehr oder weniger festen Verankerung ist. Andere Grundlagen einer chemischen Fixierung sind jedenfalls noch nicht nachgewiesen worden.

Zusammenfassung.

Um die Art der chemischen Bindung von Digitalisglykosiden an Serumeiweißverbindungen zu erklären, wurden die quantitativen Verhältnisse dieser Bindung unter verschiedenen Bedingungen geprüft. Die Bindungsversuche wurden unter Verwendung des früher beschriebenen Verfahrens der Austauschdialyse ausgeführt. Die Bestimmung der Glykosidkonzentrationen erfolgte dabei stufenphotometrisch auf der Grundlage der Baljetschen Farbreaktion.

1. Milieubedingungen: Die Bindungsfähigkeit von Serumeiweiß für Digitoxin wird durch p_H-Veränderungen in begrenztem Bereich und durch Erhöhung des Ca-Gehalts nicht beeinflußt. Dialysiertes Serum verliert nichts an Bindungsfähigkeit, und Zusatz von Serumdialysat ist ohne Einfluß. Durch Erwärmen inaktiviertes Serum verliert seine Bindungsfähigkeit für Digitoxin und gewinnt sie durch Reaktivierung wieder.

2. Die Bindung scheint bei Prüfung steigender Konzentrationen nicht den Gesetzen der Adsorption zu folgen. In niedrigen Konzentrationen ist die Bindung sogar relativ geringer. Temperatureinflüsse machen sich nicht geltend, weder im Sinne einer Beeinflussung der Bindung nach

* Anmerkung: Folgende Untersuchungen von Dybing und Holzhausen (die Arbeit erscheint in diesem Band) haben gezeigt, daß die Eiweißfraktionen aus Skelet- und Herzmuskulatur ähnlich wie die Serumeiweißverbindungen die Glykoside zu binden vermögen.

[22] Genuit, H., u. W. Eschbach: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 302 (1938).

Adsorptionsgesetzen noch nach van 't Hoffs Regel der Temperaturabhängigkeit chemischer Umsetzungen. Adsorptionsverdrängende Mittel wie Gallensäuren oder Saponine hemmen die Bindungsfähigkeit nicht.

3. Die Bindung an die Eiweißstoffe ist für das Strophanthin reversibler Natur und beschränkt reversibel auch für das Digitoxigenin; für das Digitoxin dagegen besteht praktisch keine Reversibilität.

4. Die Bindung von Digitoxin an Eiweiß verläuft schneller als die des Strophanthins.

Die Bedeutung dieser Befunde für die praktischen Verteilungs- und Bindungsverhältnisse im Organismus sowie die möglichen chemischen Grundlagen solcher Bindungsvorgänge werden allgemein erörtert.

Das in dieser Arbeit verwendete Stufenphotometer der Firma Zeiss, Jena, wurde uns von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. Westf. (Direktor: Prof. Dr. L. Lendle.)

Über die Bindung von Digitalisstoffen an die Eiweißfraktionen von Herz- und Skeletmuskel.

Von

Ottar Dybing, Oslo, und **Hans Georg Holzhausen.**

(Eingegangen am 10. November 1939.)

Zur Frage der Bindungsbedingungen von Digitalisstoffen am Herzen und anderen Organen sowie an zerkleinertem Organgewebe sind zahlreiche Untersuchungen ausgeführt worden. Es wird heute ziemlich allgemein angenommen, daß die Bindung der Digitalisstoffe im Gewebe auf einer der primären Adsorption folgenden Verankerung durch chemische Reaktionen beruht. Fischer[1] hat für diese Bindungsvorgänge die Begriffe „Membranphase" und „Fixationsphase" geprägt und am isolierten Froschherzen die zeitlichen Bedingungen für diese Verhältnisse ermittelt.

Die adsorptive Bindung der etwas oberflächenaktiven, saponinähnlichen Glykoside ist mehrfach im einzelnen studiert worden. In einer vorausgehenden Arbeit hat Korfmacher[2] die wesentlichen Ergebnisse aus der Literatur zusammengestellt und in eigenen Versuchen nachgewiesen, daß diese Adsorptionsbindungen für die eigentliche Digitaliswirkung nicht verantwortlich gemacht werden können, weil zwischen der Wirksamkeit und der Adsorptionsfähigkeit der einzelnen Glykoside und Genine gar keine erkennbaren Beziehungen bestehen, wie sie z. B. für narkotische und lokalanästhetische Wirkstoffe bekannt sind. Die adsorptive Bindung dürfte wohl nur für die Geschwindigkeit der ersten Bindung am Gewebe und damit für die Verteilung im Organismus bedeutsam sein.

Das Wesen der chemischen Bindung im Gewebe, also der chemische Angriffspunkt der Digitalisverbindungen, ist noch nicht bekannt. Eine Klärung dieser Frage könnte vielleicht auch das Verständnis für den Wirkungsmechanismus vermitteln.

Daß chemische Vorgänge bei dieser Fixierung eine Rolle spielen werden, ist von Fischer bis zu einem gewissen Grade wahrscheinlich gemacht worden beim Studium der Temperatureinflüsse auf diese Bindungsvorgänge. Die Beschleunigung der Giftwirkung und Bindung bei Temperaturerhöhungen soll annähernd der van 't Hoffschen Regel für chemische Reaktionen entsprechen. Eine Frequenzbeschleunigung durch Temperatursteigerung konnte in diesen Versuchen zwar ausgeschlossen werden, nicht aber eine Empfindlichkeitssteigerung des Herzens, welche die Wirkungsbeschleunigung auch zum Teil zu erklären vermag. Fischer[1] konnte

[1] Fischer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **130**, 111 (1928). — [2] Korfmacher: Ebenda **194**, 217 (1939).

übrigens auch die gleiche Temperaturabhängigkeit für die Wirkung des Digitoxigenins feststellen, für das er eine reversible Bindung an Nebenvalenzen annimmt.

Für die Bindungsreaktion werden von Fischer die sekundären alkoholischen OH-Gruppen des Moleküls verantwortlich gemacht. Die spezifische ungesättigte Lactongruppe dürfte bei dieser Verankerung nicht in Bindung treten, obwohl gerade sie für die spezifische Wirkung entscheidend ist. Über die im Strukturaufbau gegebenen Ursachen für eine verschiedene Haftfähigkeit der einzelnen Glykoside können noch keine sicheren Angaben gemacht werden.

Es ist auch schon gelegentlich der Versuch unternommen worden, das Bindungsverhältnis zu verschiedenen gelösten Stoffen in vitro zu ermitteln. Eine spezifische Neigung zur Bindung an bestimmte Organbestandteile scheint nicht zu bestehen, wie sie etwa für die Saponin-Cholesterinbindung nachgewiesen ist.

Von verschiedenen Autoren ist eine spezifische Bindung an die funktionell wichtigen Phosphatide, die im Herzen auch in großer Menge vorhanden sind, angenommen worden. Schliomensum[3] hat diese Frage wohl zuerst bearbeitet und konnte dabei feststellen, daß aus dem Herzen von Menschen und Tieren sich ein Gemisch alkohollöslicher Phosphatide gewinnen läßt, das die Glykoside zu binden vermag. Ähnlich gewonnene Fraktionen aus Leber und Skeletmuskel sollen nicht so regelmäßig und deutlich binden. Die Ergebnisse sind aber nicht sehr überzeugend, weil die Bindung an den Phosphatidemulsionen wohl auch weitgehend adsorptiv sein kann und von der Teilchengröße solcher Emulsionen bestimmt sein muß.

Kutschera-Eichbergen[4] hat diese Versuche später nach anderer Richtung hin erweitert und gleichfalls eine Beziehung der Glykoside zu den Phosphatiden angenommen. Seine Beobachtungen an pathologischen Menschenherzen, nach denen die schwerlöslichen (Reserve-) Phosphatide des Herzens bei chronischer Digitaliswirkung mobilisiert werden sollen, das heißt in grobdisperse, äther- (also leicht-) lösliche Fraktionen verwandelt werden, konnte zwar von Weese und Weilguny[5] an Katzenherzen bestätigt werden; diese Autoren konnten aber keinen Zusammenhang zwischen der Digitalisempfindlichkeit und dem Phosphatidgehalt der Herzen feststellen. Im Gegensatz hierzu könnte aber eine solche Annahme auf Beobachtungen von Zain[6] aufgebaut werden, nach denen am Froschherzen die Magnesiumempfindlichkeit in Parallele zum Phosphatidgehalt jahreszeitlich stark schwankt. Die Digitalisempfindlichkeit weist nämlich ähnliche Unterschiede in den verschiedenen Jahreszeiten auf. Ein direkter Beweis für eine spezifische Digitalisbindung an diese Stoffe ist dies natürlich auch nicht.

Einen Hinweis auf die Digitalisbindung an die Eiweißkörper bieten die Beobachtungen von Hoekstra[7]. Er zeigte, daß Digitoxin bei Zusatz von Serumeiweiß entgiftet werden kann, während Strophanthin unter gleichen Bedingungen nicht gebunden wird. Die genaueren quantitativen Bindungsbedingungen konnten neuerdings von Lendle und Mitarbeitern[8] ermittelt werden. Es wurde dabei festgestellt, daß nur die Albumine des Serums, nicht aber die Globuline solche Bindungen eingehen. Nach Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit sprechen die Bindungsverhältnisse

[3] Schliomensum: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **63**, 294 (1910). — [4] Kutschera-Eichbergen: Wien. Arch. inn. Med. **18**, 209 (1932). — [5] Weese u. Weilguny: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **167**, 89 (1932). — [6] Zain: Ebenda **190**, 605 (1938). — [7] Hoekstra: Ebenda **162**, 663 (1931). — [8] Lendle und Mitarbeiter: Ebenda **194**, 205 (1939).

nicht für adsorptive Vorgänge, sondern für reversible chemische Bindungen, vermutlich im Sinne von Molekülverbindungen durch Nebenvalenzen.

Es schien nun von Interesse zu studieren, wie sich die Gewebseiweißstoffe zu den Glykosiden verhalten. Können aus diesen Bindungsbedingungen etwa Schlüsse auf die Bedeutung dieser Reaktionen für die eigentliche Muskelwirkung dieser Stoffe gezogen werden? In diesen Versuchen mußten die verschiedenen Eiweißfraktionen aus Skeletmuskel und Herzmuskel gegen verschiedene Glykosidverbindungen unter ähnlichen Bedingungen wie früher die Serumeiweißkörper geprüft werden.

Über die Zusammensetzung der Skeletmuskeleiweißstoffe und ihr chemisches Verhalten sind wir durch die Forschungsergebnisse von Weber[9] und zahlreichen anderen Autoren[10] gut unterrichtet. Für die Eiweißstoffe des Herzmuskels gilt nicht das gleiche. Hier liegen wohl nur einige ältere Veröffentlichungen über die Zusammensetzung vor[11]. Anscheinend ist diese Frage noch nicht mit den neuen Methoden, die sich bei der Aufarbeitung des Skeletmuskels bewährt haben, bearbeitet worden.

Aus den Ergebnissen von Weber und Mitarbeitern seien zunächst die für unsere Fragestellung wichtigsten Resultate herausgestellt. Der Skeletmuskel enthält im wesentlichen drei Eiweißstoffe, deren Anteil an der Muskelsubstanz Weber in der folgenden Tabelle kurz zusammenfaßt.

Tabelle 1 (Aus Umschau **1939**, S. 2). Eiweißkörper des Kaninchenmuskels.

	% des Muskeleiweiß		Isoelektrischer Punkt	η' 1%	Molekulargewicht
	weißer Muskel	roter Muskel			
Myogen	22	17	pH 6,3	1,04	81 000
Globulin X	22	17	pH 5,1	1,14—1,20	140 000—180 000
Myosin	39	39	pH 5,4	mehr als 10	etwa 1 000 000
Stroma	17	27	—	—	—
		Serumalbumin		1,04	70 000
		Serumglobulin		1,18	104 000— 175 000

η' 1% gibt an, wievielmal die Viskosität einer 1%igen Lösung des Eiweißkörpers so groß ist wie die Viskosität (innere Reibung) derselben Lösung ohne Eiweiß.

Nach ihren Eigenschaften entsprechen Myogen und Globulin X dem Albumin und Globulin des Serums, während das Myosin am ehesten mit Fibrinogen vergleichbar ist. Myogen ist in viel höheren Konzentrationen löslich, als es im Muskel vorkommt, es muß sich also auch in der Muskelfaser in Lösung befinden. Dagegen ist ein Teil des Globulins X, vor allem aber

[9] Weber: Erg. Physiol. **36**, 109 (1934) und weitere Arbeiten. — [10] Muralt u. Edsall: J. biol. Chem. (Am.) **89**, 315 (1930); Fürth: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **36**, 231 (1895); Fürth: Erg. Physiol. **17**, 363 (1919). Dort auch ältere Literatur. — [11] Saxl: Hofmeisters Beitr. **9**, 1 (1906); Danilowski: Z. physiol. Chem. **7**, 125 (1882).

das Myosin im Muskel als Struktur vorhanden. Nach den Untersuchungen von Weber [9] und seinen Mitarbeitern und anderen Autoren haben wir im Myosin mit Sicherheit die eigentliche Kontraktionssubstanz des quergestreiften Muskels, nämlich den Baustein der Muskelfibrillen zu sehen. Besonders schlüssige Beweise für die Richtigkeit dieser Tatsache lassen sich aus dem Studium der Doppelbrechung unter verschiedenen Bedingungen ziehen (Weber [9]).

Nach den Untersuchungen von Lendle und Mitarbeitern [8] an den Serumeiweißfraktionen könnte man damit rechnen, daß sich das Myogen ähnlich dem Albumin, die beiden anderen Stoffe mehr wie Serumglobulin verhalten, wenn man sie auf ihre Bindungsfähigkeit für Digitalisglykoside prüft. Bei den letzteren dürfte sich danach keine wesentliche Bindungsfähigkeit für Digitaliskörper finden.

Methodik.

Gewinnung der Muskeleiweißfraktionen.

Zu unseren Versuchen verwandten wir Lösungen der verschiedenen Eiweißfraktionen Myosin, Globulin X und Myogen, die aus der Skeletmuskulatur des Kaninchens und aus Kalbsherz gewonnen wurden.

Die Kaninchenmuskulatur entnahmen wir nach Tötung des Tieres durch Nackenschlag und Durchströmen der hinteren Extremitäten mit eisgekühlter Ringerlösung von der Aorta abdom. aus. Man erhielt so eine fast blutfreie, nur schwach gelblich gefärbte Muskulatur, die von Sehnen, gröberen Gefäßen und Nerven befreit, weiterverarbeitet wurde. Zu unseren Versuchen mit Eiweißfraktionen des Herzmuskels wurde das sofort nach dem Tode entnommene Herz von der Aorta her mit kalter Ringerlösung durchspült und von faserigen und Fettgewebsteilen befreit. Trotz Durchspülung des Koronarsystems bis zum Abfließen farbloser Ringerlösung gelang es nicht, ganz von Hämoglobin freie Eiweißlösungen zu erhalten (es handelte sich hier offenbar um Myohämoglobin). Da aber in früheren Versuchen festgestellt war, daß keine Bindung von Digitalisstoffen an Hämoglobin erfolgt, war diese prozentual geringe Beimischung für unsere Versuche als unwesentlich zu betrachten.

Die Herz- und Skeletmuskulatur wurde nach der Entnahme in der Organmühle von Latapie zu einem feinen Brei zerrieben und danach mit der folgenden Lösung zur Extraktion angesetzt:

Natriumcarbonat mol/100,
Natriumhydrocarbonat mol/25,
Kaliumchlorid 0,6 mol.

Diese Lösung hatte ein p_H von 9,0 bis 9,1. Da wir keinen Wert auf quantitative Extraktion der in der Muskulatur enthaltenen Eiweißkörper legten — wie z. B. Weber in seinen Untersuchungen tun mußte —, begnügten wir uns mit einer zweimaligen, je 12 Stunden dauernden Extraktion mit dieser Lösung. Im Anschluß daran folgten eine oder zwei Extraktionen mit einer stärker alkalischen Lösung.

Natriumcarbonat mol/25,
Natriumhydrocarbonat mol/25,
Kaliumchlorid 0,6 mol.

Das entspricht etwa einem p_H von 9,8. Die Extraktionsdauer war die gleiche wie bei der vorhergehenden Lösung. Es wurden jedesmal 100—300 g Muskelbrei mit der fünf- bis sechsfachen Menge Extraktionsflüssigkeit angesetzt. Da der ganze

Vorgang 2 Tage dauerte, mußte natürlich dauernd unter Zusatz von Toluol gearbeitet werden. Das ungelöste Stroma wurde durch Filtrieren und Zentrifugieren abgetrennt.

Nach dem Vorgange von Weber[9] erfolgte die Darstellung der einzelnen Eiweißfraktionen durch Dialyse bei verschiedenem p_H und KCl-Gehalt. Die Ausfällung des Myosins geschah aus der in Cellophanschläuchen befindlichen Eiweißlösung durch Dialyse gegen eine 0,03 mol. KCl-Lösung bei einem p_H von 6,3 (Phosphatpuffer mol/130). Nach Abzentrifugieren des Niederschlags wurde die Dialyse gegen eine KCl-freie Lösung eines mol/90 Acetatpuffers von einem p_H von 5,0 fortgesetzt. Unter diesen Verhältnissen fällt die Globulin X-Fraktion aus. Die nach Abzentrifugieren des Niederschlages verbleibende Lösung stellt die Myogenfraktion dar. Sie erwies sich jedoch für unsere Versuche als zu stark verdünnt. Der Eiweißgehalt betrug im allgemeinen nur 0,15—0,2%. Wir haben daher unsere Myogenlösungen immer in folgender Weise dargestellt: Eine Menge von 100—300 g Muskelbrei wurde mit der gleichen Menge Ringerlösung 24 Stunden lang extrahiert. Dabei geht kaum Myosin, wenig Globulin X, aber die größte Menge des in der Muskulatur enthaltenen Myogens in das Extrakt. Die durch Auspressen des Breies aus Muskulatur und Ringerlösung gewonnene Flüssigkeit wurde dann sofort gegen destilliertes Wasser dialysiert. Dann erhielt man Myogenlösungen von 1,0—1,5% Eiweißgehalt.

Die Niederschläge der Dialysen wurden nach mehrmaligem Waschen mit der Pufferflüssigkeit, gegen die dialysiert worden war, in einer 0,6 mol. Lithiumchloridlösung, die mit mol/25 Boratpuffer auf ein p_H von 8,08 gebracht worden war, gelöst. Der salzfreien Myogenlösung wurden entsprechende Mengen Lithiumchlorid und Boratpuffer zugesetzt, so daß immer unter den gleichen Salzverhältnissen gearbeitet wurde.

Die Verwendung von Lithiumchlorid und Boratpuffer erwies sich als erforderlich, da sich mit Kaliumchlorid und auch mit Phosphaten, wie sie von Weber (l. c.) als Lösungsmittel angegeben wurden, bei der kolorimetrischen Untersuchung Schwierigkeiten ergaben. Beide Stoffe bilden mit der dabei verwandten Pikrinsäure Niederschläge.

In den gewonnenen Lösungen wurde der Eiweißgehalt durch Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl in der Anordnung nach Haarmann[12] bestimmt.

Prüfung der Bindung der Digitalisstoffe.

Die Prüfung der Bindung der Digitalisglykoside erfolgte mit Hilfe der Methode der Austauschdialyse und der Bestimmung des nicht gebundenen Glykosidanteils mit der Baljetschen Reaktion. Das Verfahren, das in der Arbeit von Haarmann, Hagemeier und Lendle[8] beschrieben ist, mußte wegen der besonderen Löslichkeitsbedingungen der in unseren Versuchen verwandten Eiweißkörper in einigen Punkten abgeändert werden.

Wie oben erwähnt, waren schon bei der Auswahl der Salze und Pufferlösung zum Auflösen der Eiweißkörper Schwierigkeiten aufgetreten. Weiterhin stellte sich heraus, daß unter den sonst eingehaltenen Bedingungen keine Konstanz der Ergebnisse zu erlangen war, und daß die in den vorhergehenden Arbeiten festgestellten Faktoren für die einzelnen Digitalisstoffe unter unseren Versuchsbedingungen falsche Werte ergaben. Die maximale Farbtiefe trat bei der Ablesung am Stufenphotometer nicht nach 17 Minuten ein, wenn man wie üblich eine 1%ige Pikrinsäure benutzte, der auf 1000 ccm 50 ccm 10%ige Natronlauge zugesetzt waren, sondern erst nach 1—$1^1/_2$ Stunden. Außerdem schwankte das Maximum der Farbtiefe anscheinend

[12] Haarmann: Biochem. Z. **296**, 121 (1938).

noch ganz erheblich im Zusammenhang mit der Temperatur. Annäherungswerte wurden erhalten, wenn man nach $1^1/_2$ Stunden ablas und zur Berechnung einen für diese Zeit gefundenen empirischen Faktor verwandte. Diese Unterschiede hatten ihre Ursache in der Störung des Alkalitätsgrades durch den Boratpuffer. Es wurden zuverlässige Werte erst erhalten, als der Pikrinsäurelösung nicht 10%ige, sondern 15%ige Natronlauge zugesetzt und nach 20 Minuten abgelesen wurde. Die unter diesen Verhältnissen ermittelten empirischen Faktoren für die in unseren Versuchen verwandten Digitalisstoffe waren für Digitoxin „Roche" 39,2 und für k-Strophanthin Boehringer 40,0.

Versuchsansatz.

Der Versuchsansatz gestaltete sich immer in der im folgenden Beispiel gegebenen Weise.

1. Leerversuch (doppelt oder dreifach angesetzt). Außenflüssigkeit: 1,4 ccm Alkohol 30%ig und 5,6 ccm boratgepufferter 0,6 mol. KCl-Lösung. Innenflüssigkeit: 1,4 ccm Alkohol 30%ig und 5,6 ccm Muskeleiweiß in boratgepufferter KCl-Lösung, z. B. Myosin 0,77%. Eiweißendkonzentration also 0.616% (Diffusionshülse von Schleicher & Schüll, Nr. 579).

2. Strophanthinversuch. Außen: 1.4 ccm Strophanthinlösung 1:10000 in 30%igem Alkohol und 5,6 ccm Pufferlösung. Innen: 1,4 ccm Strophanthinlösung und 5,6 ccm Eiweißlösung. Endkonzentration des Strophanthins also innen und außen 2 mg%.

3. Digitoxinversuch. Wie unter 2. Nur statt der Strophanthinlösung Digitoxinlösung gleicher Konzentration.

Die Versuche, bei denen Glykosid zugegeben wurde, setzten wir regelmäßig doppelt, dreifach oder auch fünffach an, um die Streuung der Ergebnisse besser beurteilen zu können. Die Abweichungen der einzelnen Ergebnisse voneinander war manchmal erheblich. Sie war sicher durch die mit der hohen Viskosität, z. B. des Myosins, erklärbaren Diffusionsunterschiede und das Eintreten adsorptiver Bindung an ausgefallene Eiweißflocken verursacht. Wegen dieser Streuung ist es auch nicht möglich, unsere Ergebnisse streng quantitativ auszuwerten. Sie geben nur die qualitativen Verhältnisse und in Annäherung auch die Unterschiede in der Bindungsgröße der einzelnen Muskeleiweißfraktionen wieder.

Die Versuchsansätze wurden 3 Tage lang im Eisschrank gehalten. Darauf wurden 6 ccm der Außenflüssigkeit mit 6 ccm der oben erwähnten alkalischen Pikrinsäurelösung versetzt und nach 20 Minuten im Stufenphotometer gegen eine Vergleichslösung photometriert. Diese Vergleichslösung bestand aus 1,4 ccm 30%igem Alkohol, 5,6 ccm boratgepufferter KCl-Lösung und 7,0 ccm alkalischer Pikrinsäurelösung. Der Leerwert wurde von den erhaltenen Ergebnissen abgezogen und der auf 1 ccm Küvettenlänge reduzierte Wert mit dem Faktor des betreffenden Glykosides multipliziert. Man erhält so die Menge des ungebundenen Glykosids, die von der vorgelegten Menge abgezogen wird. Danach läßt sich dann die Bindungsgröße für das Gramm Eiweiß und der Prozentsatz des gebundenen Glykosids zum ungebundenen bestimmen.

Nach der Bestimmung der Bindungsgröße wurde die Reversibilität dieser Bindung geprüft. Dazu wurde die Innenflüssigkeit, deren Gehalt an

freiem Glykosid aus dem Bindungsversuch bekannt war, zur Dialyse gegen eine Lösung von 1.4 ccm Alkohol 30%ig und 5,6 ccm boratgepufferter KCl-Lösung angesetzt. Nach 7 Tage langem Stehen im Eisschrank wurde nun die Außenflüssigkeit unter Zusatz alkalischer Pikrinsäure wieder photometriert. Falls die Glykosidbindung an die Eiweißstoffe irreversibel war, mußte sich jetzt in der Außenflüssigkeit gegenüber dem Bindungsversuch die halbe Konzentration an freiem Glykosid finden. Fand sich weniger als die Hälfte, so ergab sich daraus, daß der Austausch zwischen Innen- und Außenflüssigkeit noch nicht beendet war. Das geschah aber wohl nur bei den ersten Versuchsansätzen, die nur 5 statt 7 Tage im Eisschrank gestanden hatten. Außerdem konnte auch Glykosid an inzwischen aufgetretene Eiweißflocken adsorptiv gebunden sein. Das beobachteten wir vor allem bei stärker konzentrierten Myogenlösungen. In ihnen kam es bei Konzentrationen von über 0,5% Eiweiß immer zur Flockenbildung. Fand sich jedoch mehr Glykosid, als der Menge des beim Bindungsversuch frei gefundenen Glykosids entsprach, so mußte also ein Teil des zusätzlich gefundenen Glykosids aus der Eiweißbindung frei geworden sein.

Versuchsergebnisse.

Myogen. (Zusammenstellung der Ergebnisse siehe Tabelle 1.)

Die in der oben beschriebenen Weise aus dem Muskelbrei durch Extraktion mit Ringerlösung und sofortige Dialyse gegen destilliertes Wasser dargestellte Myogenfraktion hatte meistens einen Eiweißgehalt, der zwischen 0,95 und 1,5% lag. Es zeigte sich, daß bei diesen relativ hohen Konzentrationen — wie schon erwähnt — regelmäßig unter den Bedingungen der Austauschdialyse eine Ausflockung von Myogen auftrat. Dadurch konnte natürlich der Bindungswert erheblich verändert werden, da ja Eiweißniederschläge adsorptiv binden können. Bei Konzentrationen unter 0,5% trat jedoch keine Ausflockung mehr auf. Wir haben daher immer mit Myogenlösungen von einem Eiweißgehalt von 0,4–0,5% gearbeitet*.

Bei Verwendung der genannten Konzentrationen fanden wir beim Myogen des Skeletmuskels im Mittel für Strophanthin eine Bindungsgröße von 1070 γ g. Für Digitoxin lag der Wert noch etwas höher. Myogenlösungen von gleichem Gehalt aus Herzmuskulatur zeigten eine Bindung von 1830 γ/g Eiweiß, der Digitoxinwert lag etwa gleich hoch. Die genaue Größe dieser Zahlen könnte nur in einer sehr großen Untersuchungsreihe ermittelt werden.

* Anmerkung: Überhaupt ist zum Vergleich der Bindungsgrößen immer erforderlich, mit etwa gleichen Konzentrationen zu arbeiten, da die Bindung anscheinend durchaus nicht dem Eiweißgehalt der Lösungen parallel geht. Das zeigte sich besonders bei einem Versuch mit Globulin X, wobei eine Lösung mit einer Konzentration von 0,225% eine Strophanthinbindung von etwa 3000 γ pro Gramm zeigte, während eine andere von 1,16% nur 430 γ pro Gramm band.

Tabelle 1. Myogen.

Nr.	Eiweißkonzentration		Glykosid	Bindung in %	Bindung in γ/g	Reversibilität
			Skeletmuskel.			
1	0,4	frisch	Str.	26,7	1185	nein
2	0,4	frisch	„	26,7	1185	nein
3	0,4		„	30,1	—	—
4	0,4		„	34,6	1720	29 %
5	0,4		„	33,4	1665	7,3 %
6	0,4	frisch	Dig.	31,5	1575	nein
7	0,4	frisch	„	32,1	1615	„
8	0,44		Str.	12	545	„
9	0,44		„	15,4	702	„
10	0,44		„	25,4	1160	„
11	0,44		„	15,4	702	„
13	0,75	frisch	„	28,7	767	„
14	0,75	frisch	Dig.	24,4	600	„
			Herzmuskel.			
15	0,4		Str.	33	1650	65 %
16	0,4	frisch	„	35	1750	60 %
17	0,4	frisch	„	35,6	1780	44,5 %
18	0,4		„	40,0	2000	92 %
19	0,4		„	39,5	1975	49,5 %
20	0,4		Dig.	27	1350	46 %
21	0,4	frisch	„	33	1650	37 %
22	0,4	frisch	„	25	1254	60 %
23	0,4		„	47	2350	61,5 %
24	0,4		„	36	1800	72 %

Auch der Unterschied in der Bindungsgröße zwischen Herz- und Skeletmuskulatur kann aus diesen Zahlen nur als annähernder Wert gesehen werden, wenn auch diese Zahlen zu ergeben scheinen, daß das Herzmuskelmyogen die Digitalisglykoside stärker bindet als das des Skeletmuskels. Ein Unterschied in der Bindungsgröße zwischen frisch dargestellten und gealterten Myogenlösungen konnte nicht festgestellt werden. Auffallend war nur in einem Falle die Beobachtung, daß unter Toluol im Eisschrank aufbewahrtes Myogen, aus dem ausweislich der Stickstoffbestimmung ein Drittel des Gehalts an Myogen als Myogenfibrin (Fürth [10]) ausgefallen war, stark in seiner Bindungsgröße absank, während unter Paraffin gealterte, unverändert gebliebene Myogenlösung in ihrem Eiweißgehalt wie auch in ihrer Digitalisbindungsfähigkeit konstant blieb. Der Unterschied hängt hier also nicht wesentlich mit dem Altern der Lösung, sondern mit dem Ausfallen von vielleicht stärker bindenden Fraktionen im Myogen unter Luftzutritt zusammen.

Während die Glykosidbindung beim Skeletmuskelmyogen in unseren Versuchen fast immer irreversibel erschien, war die Bindung am Herzmuskelmyogen in weitem Maße durch Dialyse gegen glykosidfreie Außenflüssigkeit lösbar.

Globulin X. (Ergebnisse siehe Tabelle 2.)

Das durch fraktionierte Dialyse gewonnene Globulin X wurde in den aus der Tabelle ersichtlichen Konzentrationen zum Versuch verwandt. In einigen Fällen bestand Anlaß zur Annahme, daß die Bindungsfähigkeit der frischen Globulin X-Lösungen größer sei als die der gealterten*.

Tabelle 2. Globulin X.

Nr.	Eiweißkonzentration	Glykosid	Bindung in %	Bindung in γ/g	Reversibilität
		Skeletmuskel.			
1	0,3	Str.	17	1130	nein
2	0,3	„	21,7	1440	„
3	0,3	Dig.	28	1665	„
4	0,6 frisch	Str.	60,6	2020	„
5	0,6 frisch	„	59,3	1975	„
6	0,6	„	5	167	„
7	0,6	„	9,9	330	„
8	0,6 frisch	Dig.	37	1235	„
9	0,6 frisch	„	43,5	1450	„
		Herzmuskel.			
10	0,225	Str.	40,6	2923	19,8 %
11	0,225	„	42,6	3064	51 %
12	0,225	Dig.	30,4	2189	51 %
13	0,225	„	30,9	2115	50 %
14	0,58	Str.	14	433	10 %
15	0,58	„	16,5	586	16 %
16	0,58	Dig.	4	138	nein
17	0,58	„	15	517	33 %
18	1,16	Str.	23,9	422	nein
19	1,16 frisch	„	25,9	444	„
20	1,16	„	25,9	444	35 %
21	1,16	Dig.	23,9	422	17 %
22	1,16 frisch	„	21,1	360	nein
23	1,16	„	16,4	281	„

In der Tabelle 2 zeigte im Versuch 4 und 5 eine Globulin X-Fraktion vom Skeletmuskel eine Strophanthinbindung von etwa 2000 γ/g Eiweiß. 3 Wochen später (Versuch 6 und 7) bindet die gleiche Lösung, ohne daß inzwischen eine wesentliche Ausflockung eingetreten war, nur noch 200 bis 300 γ. So extreme Schwankungen haben wir allerdings sonst nicht beobachtet. In einem anderen Falle (Versuch 1, 2, 3) zeigte eine 6 Wochen alte Lösung eine Bindungsgröße von 1100—1400 γ/g, wobei aber zu bemerken ist, daß es sich hier um eine nur 0,3 %ige Lösung handelte und daß — wie wir schon oben erwähnten — dünnere Lösungen manchmal unverhältnismäßig stärker banden.

* Anmerkung: Das ergab sich schon bei unseren ersten Untersuchungen, deren Ergebnisse wir nicht in die Tabellen aufgenommen haben, da sie wegen der beschriebenen Schwierigkeiten bei der stufenphotometrischen Auswertung nicht in genügender Weise quantitativ auswertbar waren. Im allgemeinen gab dieses Material, das einen weit größeren Umfang als das in den Tabellen aufgeführte hat, die gleichen Ergebnisse wie die hier näher besprochenen.

Bei Skeletmuskelglobulin X konnten wir aus unseren Ergebnissen eine annähernde Bindungsgröße für Strophanthin von 1170 γ/g berechnen. Diese Zahl entspricht also etwa dem auch beim Skeletmuskelmyogen gefundenen Wert. Dagegen war der Bindungswert des Herzmuskelglobulins X deutlich kleiner. Es waren rund 420 γ/g. Reversibilität der Bindung konnten wir beim Skeletmuskelglobulin X nicht feststellen, sie war dagegen in einem Teil der Versuche beim Globulin X des Herzmuskels angedeutet bis deutlich vorhanden. Es ließ sich bis zu 50% des gebundenen Glykosides wieder aus der Bindung an das Eiweiß befreien. Auch hier besteht aber wieder die Möglichkeit, daß ein Teil des freien oder des freigewordenen Digitalisstoffs durch Auftreten von Eiweißflocken adsorptiv gebunden wurde. Das ließ sich bei der 10 Tage langen Versuchsdauer auch bei ziemlich niedrigen Eiweißkonzentrationen nicht immer mit Sicherheit ausschließen.

Myosin. (Ergebnisse siehe Tabelle 3.)

Die Myosinfraktion aus Herz- und Skeletmuskulatur verhielt sich im wesentlichen wie die entsprechende Globulin X-Fraktion beider Muskelarten. Die Glykosidbindungsgröße für Skeletmuskelmyosin betrug 1080 γ/g Eiweiß, die für Herzmuskelmyosin 480 γ. Auch bezüglich des Unterschiedes im Verhalten frischer und gealterter Myosinlösungen bestand gegenüber den Globulinen keine Abweichung.

Bei der Prüfung auf Reversibilität der Bindung war ebenfalls festzustellen, daß sie bei der dem Skeletmuskel entstammenden Myosinfraktion nicht nachweisbar war, während man bei dem Herzmuskelmyosin in einer Reihe von Fällen eine Reversibilität der Glykosidbindung bis zu 64% nachweisen konnte. Im Gegensatz zum Verhalten der Digitoxinbindung an Serumeiweißfraktionen konnte sowohl beim Globulin X als auch beim Myosin des Herzmuskels in einigen Fällen die Bindung reversibel gefunden werden.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Aus der Übersicht über die Bindungsgrößen für die einzelnen Eiweißfraktionen des Herz- und des Skeletmuskels geht als wesentlichstes positives Ergebnis hervor, daß diese Eiweißstoffe Digitaliskörper binden können, und zwar liegen die ermittelten Werte durchaus im Rahmen der schon in früheren Arbeiten an Bluteiweißkörpern gefundenen. Während sich das Myogen beider Muskelarten mit seinem Albumincharakter wie das Albumin des Blutes verhält, zeigt sich im Gegensatz zum Globulin des Blutes ein deutliches Glykosidbindungsvermögen sowohl des Globulins X als auch des Myosins des Herzens. Aus bisherigen Versuchen ist noch kein Eiweißkörper bekannt, der sich in seinem Digitalisbindungsvermögen mit Myosin vergleichen ließe. Seinen Eigenschaften nach käme von den Bluteiweißkörpern nur das Fibrinogen in Frage, dessen Verhalten aber noch nicht geprüft ist.

Tabelle 3. Myosin.

Nr.	Eiweiß-konzentration		Glykosid	Bindung in %	Bindung in γ/g	Reversibilität
			Skeletmuskel.			
1	0,4	frisch	Str.	59,3	2960	nein
2	0,4		„	50,5	2512	„
3	0,4		„	18,5	925	„
4	0,4		„	17,5	875	„
5	0,4		„	23,8	1188	„
6	0,4		„	14,4	717	„
7	0,4		„	15,7	788	„
8	0,4		„	12	600	„
9	0,4		„	15,4	720	„
10	0,4		„	13,4	695	„
11	0,4		„	11,3	568	„
12	0,4	frisch	Dig.	63,7	3180	„
13	0,4		„	59,2	2785	„
14	0,4		„	39	1945	„
15	0,4		„	37,1	1852	„
16	0,4		„	8,25	413	„
17	0,53		Str.	25,3	960	„
18	0,53		„	30,0	1130	„
19	0,53		„	14,5	545	„
20	0,53		„	31,6	1190	„
			Herzmuskel.			
21	0,4		Str.	16	800	ja
22	0,4		„	0	0	—
23	0,4		Dig.	27	1350	—
24	0,4		„	30	1500	nein
25	0,616	frisch	Str.	13 9	445	64 %
26	0,616		„	13,6	435	16 %
27	0,616		„	20,6	600	nein
28	0,616		„	18,3	585	60 %
29	0,616		„	14,0	473	nein
30	0,616		„	10,6	345	„
31	0,616		„	11,4	370	„
32	0,616		„	10,6	345	„
33	0,616	frisch	Dig.	0,75	24	„
34	0,616		„	1,6	51	„
35	0,616		„	2,6	83	„
36	0,616		„	2,5	80	21 %
37	0,616		„	10,1	323	16,4 %
38	0,664		Str.	11,8	350	nein
39	0,664		„	25,4	768	„
40	0,664		„	13,3	402	„
41	0,664		„	18,6	543	„
42	0,664		„	19,3	580	„

Wieweit die Abweichungen in der Bindungsgröße unter den einzelnen geprüften Eiweißfraktionen tatsächliche, nicht nur auf die Fehlerbreite der Methodik zurückzuführende sind, könnte wohl nur die Nachuntersuchung an einem noch größeren Material ergeben. Auffällig ist es jedenfalls, daß unter den Einzelfraktionen des Skeletmuskeleiweißes überhaupt kein Unterschied in der Bindungsgröße besteht. Vor allem deshalb, weil zwischen

dem Myogen des Herzmuskels einerseits und den beiden anderen Fraktionen ein sehr deutlicher Unterschied zutage tritt. Es wäre durchaus möglich, daß diese unterschiedliche Glykosidbindungsfähigkeit des gelösten Eiweißes der Muskelfaser und des in ihr Struktur bildenden für die Wirkung am Herzen von Bedeutung ist.

Wenn man unsere Bindungswerte mit denen vergleicht, die von Genuit[13] an unserem Institut bei Passageversuchen am isolierten durchströmten Herzen gefunden wurden, so ergeben sich ganz erhebliche quantitative Unterschiede. Genuit findet eine Digitoxinbindung von 1,5 bis 2,0 γ g Herzmuskel, entsprechend 120—150 mg Herzmuskeleiweiß, gegenüber unseren Werten von 500—1800 γ g Eiweiß. Mit großer Wahrscheinlichkeit ergibt sich daraus, daß die Glykoside in vivo wohl nur auf den Membranen, die ja auch zum Teil aus Eiweiß bestehen, gebunden werden. Die in unseren Versuchen nachgewiesene Bindung von Digitalisglykosiden an Muskeleiweißkörper würde also wahrscheinlich nicht die spezifische Digitalisreaktion sein. Sie ist aber vermutlich die Reaktion, welche die Fixierung und somit die Verteilung der Digitalisstoffe im Organismus beeinflußt.

Zusammenfassung.

Sämtliche bekannten Eiweißfraktionen des Herz- und des Skeletmuskels vermögen Digitalisglykoside in erheblicher Menge zu binden. Die Bindungsgröße der Skeletmuskeleiweißkörper ist etwa gleich groß. Das Myogen des Herzmuskels bindet fast doppelt soviel Glykosid wie die Eiweißfraktionen des Skeletmuskels und etwa viermal soviel wie das Globulin X und das Myosin des Herzmuskels. Die Bindung an die Herzmuskeleiweißkörper zeigt eine größere Reversibilität als die an die des Skeletmuskels.

Das in dieser Arbeit verwendete Stufenphotometer der Firma Zeiss, Jena, wurde uns von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster i. Westf. (Direktor: Prof. Dr. L. Lendle.)

Untersuchungen über die Viskositätsbeeinflussung von Muskeleiweißstoffen durch Digitalisglykoside.

Von

Hans Georg Holzhausen.

(Eingegangen am 10. November 1939.)

Unsere Untersuchungen wurden durch die Arbeit von Neuschloß und Rießer[1] angeregt, die sich mit der Viskositätsbeeinflussung von Gelatinesolen durch verschiedene auf die Muskulatur wirksame Gifte befaßte. Sie fanden deutliche Viskositätssteigerungen, vor allem bei saurer Reaktion und mit Konzentrationen von Strophanthin und Digitalin zwischen 1 : 30000 bis 1 : 40000 unter Verwendung eines halbprozentigen Gelatinesols. Gleichsinnige Veränderungen der Viskosität durch Digitalisglykoside fanden sich auch bei neutraler Reaktion und im leicht alkalischen Bereich, jedoch waren hier die Ausschläge wesentlich geringer.

Über die Bedeutung ihrer Befunde haben die genannten Autoren eine Theorie entwickelt, die etwa folgendes aussagt: Die Digitalisglykoside fördern in geringer Konzentration den Quellungszustand des Protoplasmas, vor allem bei Verschiebung des p_H nach der sauren Seite und machen damit die Kontraktion der Muskelfaser ergiebiger und energischer. Durch Auflockerung der Grenzmembranen wird dabei der Abtransport von im Stoffwechsel entstandenen Säuren erleichtert. Die bei sehr hohen Konzentrationen von Digitalisstoffen beobachtete Herabsetzung der Viskosität hat, da solche Giftkonzentrationen im Organismus nicht zu erzielen sind, keine physiologische Bedeutung. Es handelt sich hier um Konzentrationen von 1 : 1000 bis 1 : 4000. Dabei ist jedoch zu beachten, daß auch die von Neuschloß und Rießer als besonders wirksam gefundenen Konzentrationen und selbst die höchste in ihren Versuchen verwandte Giftverdünnung von 1 : 128000 schon eine Giftkonzentration darstellt, die in biologischen Versuchen oder in der praktischen Therapie nicht in Frage kommt.

Nach unseren in der vorausgehenden Arbeit[2] beschriebenen Erfahrungen über die Bindungsbedingungen von Digitalisglykosiden an die Muskeleiweißverbindungen war es naheliegend, die von Neuschloß und Rießer am Modellversuch der Gelatine angestellten Untersuchungen mit einem biologischen Substrat zu wiederholen. Dabei interessierte natürlich

[1] Neuschloß u. Rießer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **94**, 190 (1922). — [2] Dybing, O., u. H. G. Holzhausen: Ebenda **194**, 248 (1939).

die Frage, ob ein Unterschied im Verhalten von Skelet- und Herzmuskel und zwischen ihren einzelnen Eiweißfraktionen besteht, weil daraus Rückschlüsse auf etwaige spezifische Angriffspunkte und den Wirkungsmechanismus möglich sein könnten.

Methodik.

Zu unseren Versuchen benutzten wir die Muskeleiweißfraktionen, wie wir sie für die Untersuchung der Bindungsbedingungen von Digitaliskörpern mit dem Verfahren der Austauschdialyse dargestellt hatten[2]. Es war natürlich wegen der besonderen Löslichkeitsbedingungen nicht möglich, die Untersuchungen in einem so großen p_H-Bereich durchzuführen, wie es bei Neuschloß und Rießer mit Gelatinesolen geschah. Wir beschränkten uns auf die p_H-Werte 8,08, 7,36 und 7,0. Die genannten Autoren hatten auch schon in diesem Bereich deutliche Veränderungen der Gelatineviskosität beobachtet, wenn sie auch hinter denen bei einem p_H von 5,0 zurückblieben. So geben sie für eine Strophanthinkonzentration von 1 : 32000 bei einem p_H von 7.0 eine Viskositätssteigerung von 6,5% an, gegenüber einer von 11% bei einem p_H von 4.9 und einer Glykosidkonzentration von 1 : 8000. Als Grenzwert für unsere Versuche wurde ein p_H von 7.0 gewählt, weil unterhalb dieser Wasserstoffionenkonzentration das Myosin zu labil war, als daß noch sichere Viskositätsmessungen durchgeführt werden konnten, ohne daß die Gefahr des Ausflockens des Eiweißkörpers bestand.

Unsere viskosimetrischen Messungen führten wir mit dem Ostwaldschen Viskosimeter durch. Wir waren uns dabei der Fehlerquellen dieses Instrumentes bewußt, das ja wegen seines geringen Druckgefälles für Lösungen, die nicht dem Poiseuilleschen Gesetz folgen, wie bei uns z. B. die Myosinlösung, falsche Werte ergibt. Diese Fragen sind in der kritischen Arbeit von Rothlin[3] über die Viskosimetrie dargelegt worden. Wir haben daher bei Myosinlösungen Kontrolluntersuchungen mit einem Durchlaufsdruck von 40 cm Wasser gemacht, aber gegenüber den Werten bei niedrigerem Druck einen Unterschied nicht feststellen können. Für die sehr viskösen Myosinlösungen verwandten wir ein kleineres Viskosimeter mit einer Füllungsmenge von 1,7 ccm und einer Durchlaufszeit von 38,7 Sekunden für Wasser bei einer Temperatur von 21°. Für die weniger viskösen Eiweißkörper, Globulin X und Myosin, benutzten wir ein 2,35 ccm fassendes größeres Viskosimeter, das für Wasser bei 22° eine Durchlaufszeit von 98,4 Sekunden aufwies.

Bei unseren Untersuchungen kam es uns nicht auf die absoluten Werte für die Viskosität der einzelnen Eiweißstoffe an, die ja schon von Weber[4] gemessen wurden, sondern vielmehr auf die Veränderungen der Viskosität unter der Wirkung der Glykoside. Es war daher auch nicht erforderlich, stets bei der gleichen Temperatur zu arbeiten, wenn nur innerhalb der einzelnen Versuchsreihe die Temperatur konstant gehalten wurde. Wir haben den letzten, größeren Teil unserer Untersuchungen immer bei Zimmertemperatur ausgeführt, da schon geringe Schwankungen der Wärme des Wasserbades, wie sie beim Arbeiten z. B. bei Körpertemperatur nur durch Verwendung genauester Thermoregulatoren vermieden werden

[3] Rothlin: Biochem. Z. **98**, 34 (1919). — [4] Weber, H. H.: Erg. Physiol. **36**, 119 (1934).

können, anscheinend einen Einfluß auf die Viskosität unserer Eiweißfraktionen hatten. Die von uns anfangs verwandte Einrichtung arbeitete auf $^1/_{10}$ bis $^1/_{20}{}^0$ genau. Als sich jedoch im Laufe der Versuche zeigte, daß, wenn überhaupt mit Regelmäßigkeit Viskositätsveränderungen beobachtet werden konnten, diese weit unter den Werten von Neuschloß und Rießer lagen, mußte damit gerechnet werden, daß selbst diese geringen Temperaturschwankungen noch einen wesentlichen Fehler hervorrufen könnten. Für Wasser wird der Viskositätsunterschied für 1^0 Temperaturänderung mit 2% angegeben. Für Eiweißstoffe soll er besonders in der Nähe des isoelektrischen Punktes noch viel höhere Werte annehmen können. Die Viskositätsänderungen bezogen wir immer auf den Wert der unvergifteten Eiweißlösung, den wir zu Anfang und am Schluß und bei längeren Versuchsreihen auch zwischendurch feststellten.

Das Strophanthin wurde in einer wässerigen Lösung 1 : 1000 angesetzt, und zwar verwandten wir k-Strophanthin Boehringer, wie es auch Neuschloß und Rießer taten. Digitoxin haben wir nicht verwandt, weil seine Löslichkeit ohne Gegenwart von Alkohol, der unsere Untersuchungen nur gestört hätte, zu gering ist. Außerdem war uns ja aus unseren Bindungsversuchen bekannt, daß Strophanthin etwa in dem gleichen Maße wie Digitoxin gebunden wird. Das Strophanthin wurde der Eiweißlösung immer eine bestimmte Zeit vor der Untersuchung zugesetzt (10, 15 oder 60 Minuten). Das Viskosimeterröhrchen wurde jeden Tag mit warmer Chromschwefelsäure gereinigt. Zwischen den einzelnen Bestimmungen einer Reihe wurde das Röhrchen mit destilliertem Wasser mehrfach durchspült und dann unter Zuhilfenahme der Wasserstrahlpumpe mit Aceton getrocknet. Nach Einfüllen der zu untersuchenden Flüssigkeit muß man immer einige Zeit warten, damit sich die Temperatur der Flüssigkeit auch genau der des Wasserbades angleicht. Da die Untersuchungen bei Zimmertemperatur vorgenommen wurden, bestanden allerdings von vornherein keine großen Temperaturunterschiede. Beim Einfüllen der Untersuchungsflüssigkeit muß sehr genau auf die Vermeidung von Blasenbildung geachtet werden, da sich sonst Ungenauigkeiten der Messung ergeben. Stets muß bei der Bestimmung der Durchlaufszeit das Mittel aus mehreren Durchläufen genommen werden. Falls die Werte anfangs schwanken, was besonders bei Stoffen mit anomaler Viskosität wie Myosin und Gelatine vorkommt, muß man so lange durchlaufen lassen, bis man einigermaßen konstante Werte erhält, oder man muß bei höherem Durchlaufsdruck arbeiten. Im allgemeinen stimmen die Werte zweier Bestimmungen auf ein bis zwei Zehntel Sekunden genau überein. Bei größeren Abweichungen wurde der Mittelwert aus fünf Ablesungen genommen.

Versuchsergebnisse.

Wie man aus der beigefügten Tabelle ersehen kann, wurde, im ganzen gesehen, eine wesentliche Viskositätsbeeinflussung durch Zusatz von Strophanthin in den von uns verwandten Konzentrationen und in dem von uns geprüften p_H-Bereich nicht gefunden. Eine geringe Viskositätssteigerung, die jedoch selten 1% überschritt, wurde mit einer etwas größeren Häufigkeit, wenn auch nicht ganz regelmäßig, beim Myosin mit Konzentrationen zwischen 1 : 40000 und 1 : 100000 gesehen. Ein Unterschied zwischen Herzmuskeleiweiß einerseits und den Eiweißfraktionen aus Skeletmuskulatur andererseits, sowie zwischen frisch dargestellten und gealterten Lösungen konnte nicht nachgewiesen werden.

Wegen der weitgehend negativen Ergebnisse unserer Untersuchungen, die wir auf Grund der Angaben von Neuschloß und Rießer[1] nicht

Tabelle. Viskositätsveränderungen von Muskeleiweißverbindungen durch k-Strophanthin.

Das Strophanthin wurde den Eiweißlösungen jeweils in folgenden Verdünnungen zugesetzt: 1 : 5000 oder 1 : 8000, 1 : 10000, 1 : 20000, 1 : 40000, 1 : 80000 oder 1 : 100000. Jeder Einzelwert der Tabelle entspricht der maximalen Viskositätsveränderung in einer solchen Versuchsreihe.

Eiweißstoff	Konzentration in %	p_H	Strophanthinkonzentration	Viskositätsänderung in %	Bemerkungen
			Herzmuskel.		
Myogen	0,55	8,08	1 : 20000	+0,9	
„	0,36	8,08	—	—	
„	0,225	7,36	1:10—20000	+0,45	
„	0,225	7,0	—	—	
Globulin X	0,24	8,08	1 : 80000	+0,87	
„ „	0,73	8,08	1 : 10000	+3	Kontrolle 0 %
„ „	0,36	7,36	1 : 20000	−0,88	
„ „	0,38	7,0	1 : 10000	+0,56	
Myosin	0,3	8,08	1 : 10000	−0,65	
„	0,61	8,08	1 : 10000	+0,71	
„	0,61	8,08	1 : 100000	+1,55	Druck 40 cm Wasser
„	0,38	7,36	1 : 10000	+0,71	„ 40 „ „
			1 : 100000	−0,71	„ 40 „ „
„	0,38	7,36	1 : 100000	−1,44	„ 40 „ „
„	0,38	7,36	1 : 10000	+0,98	„ 40 „ „
„	0,38	7,0	1 : 40000	+1,45	Kontrolle 0,36 %
„	0,41	7,0	1 : 40000	+0,91	
			Skeletmuskel.		
Myogen	1,2	unge-puffert	1 : 40000	+0,24	
„	1,07	7,36	1 : 5000	+1,21	
„	1,07	7,36	1 : 40000	−0,48	
„	1,07	7,36	1 : 10000	−0,85	
Globulin X	0,625	8,08	1 : 5000	+0,6	
Myosin	0,41	8,08	1 : 5000	+0,87	

erwartet hatten, haben wir uns bemüht, wenigstens in Kontrolluntersuchungen die Ergebnisse dieser Autoren zu bestätigen. Über diese Bemühungen kann zusammenfassend gesagt werden, daß sich lediglich im p_H-Bereich von etwa 8.0 mit halbprozentiger Gelatinelösung und Strophanthinzusatz etwa die Viskositätsveränderungen erzielen ließen, wie sie von den Autoren angegeben wurden. Aber in diesem Bereich finden sich ja überhaupt nur sehr geringe Ausschläge.

Es ist uns nicht gelungen, die Untersuchungen in größerem Umfang zu bestätigen. Wir haben nach Möglichkeit unter den gleichen Bedingungen zu arbeiten gesucht wie Neuschloß und Rießer. Bei den nicht sehr genauen methodischen Angaben in ihrer Arbeit bestehen natürlich besonders in der Zubereitung der Gelatinelösung erhebliche Möglichkeiten unterschiedlichen Vorgehens. Rothlin[3] gibt in der schon oben zitierten Arbeit an, daß die Viskosität der Gelatine sich in den nächsten Stunden nach dem Herstellen der Lösung ganz erheblich ändert. Konstante Verhältnisse

bekommt man erst dann, wenn die Gelatinelösung stundenlang gekocht wird. Dabei wandelt sich die Gelatine in β-Gelatine um, die ganz andere Eigenschaften als die gewöhnliche hat. Nach unserer Auffassung besteht die Möglichkeit, daß ein Teil der Ergebnisse in der zitierten Arbeit durch die spontanen Veränderungen der Gelatinelösung nach ihrer Herstellung vorgetäuscht worden ist. Eine andere Erklärung haben wir für den fast völligen Mißerfolg unserer Nachprüfungen nicht finden können.

Zusammenfassung.

Unter Einwirkung von k-Strophanthinkonzentrationen von 1 : 8000 bis 1 : 100000 konnten wir an den Eiweißfraktionen von Herz- und Skeletmuskel (Myosin, Globulin X und Myogen) im p_H-Bereich von 7.0 bis 8.1 Viskositätsänderungen nicht beobachten.

Nach den negativen Ergebnissen unserer Bemühungen, eine Viskositätsveränderung von Eiweiß und Gelatinesolen durch Strophanthin nachzuweisen, erscheint uns auch der Hypothese von der Veränderung des Quellungszustandes des Muskelplasmas oder der Zellmembranen durch Digitalisstoffe eine Hauptstütze entzogen zu sein.

Es konnte auf Grund der Viskositätsprüfungen ferner auch kein Beweis dafür erbracht werden, daß die früher in vitro nachgewiesene hohe Bindungsfähigkeit der verschiedenen Eiweißfraktionen aus Herz- und Skeletmuskulatur für Digitalisstoffe eine funktionelle Bedeutung für den Kontraktionsablauf besitzt.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt/Main.

Zur Frage des Follikelhormongehaltes der Progynondragées.

(Eine Erwiderung auf die Erklärung von Walther Hohlweg in Naunyn-Schmiedebergs Archiv **194**, 129 (1939) zur Arbeit von W. Koll und F. Külz in Naunyn-Schmiedebergs Archiv **193**, 506 (1939).

Von

W. Koll und **F. Külz.**

(Eingegangen am 16. Dezember 1939.)

Zu der im Titel erwähnten Erklärung von Hohlweg, deren Manuskript uns auf Veranlassung des Herausgebers dieser Zeitschrift zur Stellungnahme übersandt wurde, bemerken wir folgendes:

1. Die Tatsache, daß chemisch verschiedene, oestruserzeugende Substanzen bei Prüfung an verschiedenen Tierarten, z. B. Ratte und Maus, ein verschiedenes Zahlenverhältnis ihrer Wirksamkeiten ergeben und die damit zusammenhängenden Probleme sind uns keineswegs so ungenügend bekannt, wie Hohlweg glaubt annehmen zu dürfen. Darüber gibt eine genauere Durchsicht der Gemeinschaftsarbeit des Berliner und Frankfurter Pharmakologischen Instituts[1] sowie der Arbeit von Koll und Nocken[2] hinreichend Aufschluß. Ein nochmaliger Hinweis findet sich im letzten Absatz der von Hohlweg bezüglich der Ergebnisse von Progynon kritisierten Arbeit von Koll und Külz.

2. Aus den verschiedenen Wirkungsrelationen chemisch verschiedener oestruserzeugender Substanzen an verschiedenen Tierarten ergeben sich für die Standardisierungspraxis die Folgerungen:

a) Nur oestronhaltige Präparate können ohne Angabe der zur Testierung benutzten Tierart nach Einheiten des internationalen Oestronstandards deklariert werden.

b) Bei chemischen Unterschieden zwischen ausgewerteten Präparaten und internationalem Oestronstandard ist in der Deklaration zum mindesten noch die Angabe der zur Auswertung benutzten Tierart erforderlich, anderenfalls wird die Deklaration inhaltlos und unkontrollierbar.

[1] Behrens, B., W. Heubner, W. Koll u. F. Külz: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **186**, 121 (1937). — [2] Koll, W. u. H. Nocken: Ebenda **191**, 340 (1939).

3. Auf Grund der aus den wissenschaftlichen Laboratorien von Schering veröffentlichten Arbeit von Schoeller, Dohrn und Hohlweg [3] glaubten wir annehmen zu dürfen, daß diese beiden notwendigen Folgerungen auch auf die Standardisierung und Deklaration des von Schering hergestellten Progynons angewendet würden. Da die Deklaration nur Einheiten des internationalen Oestronstandards und kein Testtier angibt, haben wir das Progynon als ein Oestronpräparat ansehen müssen und haben es deshalb an der Maus gegen den internationalen Oestronstandard ausgewertet. Wir waren demnach berechtigt, das von uns gefundene Wirkungsdefizit des Progynons als einen Mangel an wirksamer Substanz zu interpretieren. Wir waren dazu um so mehr berechtigt, als wir nach der früheren Deklaration, welche neben den internationalen Einheiten auch noch Mäuseeinheiten angab, annehmen mußten, sogar das gleiche Testtier zu benutzen wie die Firma Schering.

4. Aus der vorstehenden Erklärung von Hohlweg erfahren wir zum ersten Male, daß in den Progynondragées kein reines Oestronpräparat vorliegt, sondern ein Rohkristallisat, welches ein Gemisch von Oestron, Oestradiol und Oestriol darstellt, und ferner, daß dieses früher auch nach Mäuseeinheiten (neben internationalen Einheiten) deklarierte Gemisch jetzt an Ratten standardisiert wird. Da dieser Sachverhalt sich weder aus den gedruckten Beilagen der von uns untersuchten Progynon-Dragée-Packungen noch aus den uns zugänglich gewesenen anderweitigen Angaben der Firma Schering ergibt, müssen wir den Vorwurf von Hohlweg, bei der Interpretation unserer Versuchsergebnisse einen Fehler begangen zu haben, entschieden zurückweisen.

5. Nach der eingehenden Beschäftigung mit den Beziehungen zwischen zeitlichem Verlauf des Hormonangebots und erzieltem Wirkungsgrad, die durch unsere früheren Arbeiten [1, 2] ausreichend belegt ist, können wir sogar ohne die „klar verständlichen" Erörterungen von Schoeller und Mitarbeitern und Pedersen, Bjergaard, auf welche Hohlweg verweist, nicht darüber „erstaunt" sein, daß 1 ME. wässerige Hormonlösung ein anderes Wirkungsverhältnis zum internationalen Standard aufweisen kann als 1 ME. einer öligen Lösung. Gleiche Versuchstechnik bei jeweils gleichem Lösungsmittel vorausgesetzt, beweisen solche Befunde, die uns durchaus nicht fremd sind, allerdings nur eine Differenz des Reinheitsgrades oder der chemischen Struktur der geprüften oestrogenen Substanz gegenüber dem internationalen Standard.

Wir haben schon in den früheren Untersuchungen an der Maus zeigen können [1], daß durch geeignete Dosenfraktionierung der sonst sehr erhebliche Wirkungsunterschied des Hormons bei Injektion wässeriger und öliger

[3] Schoeller, W., M. Dohrn u. W. Hohlweg: Klin. Wschr. **1935**, S. 826.

Lösungen so gut wie völlig ausgeglichen werden kann, wir dürfen also ohne nennenswerten Fehler unseren früheren Befund, daß 1 ME. wassergelösten Progynons nicht 5 IE., sondern 1.24 IE. entsprach, in Beziehung zu den neuerdings mit Hilfe öliger Lösungen erhaltenen Ergebnissen setzen. Die Bemerkung auf S. 519 der Arbeit von Koll und Külz beruht also nicht auf mangelnder Erfahrung und ist durchaus nicht so abwegig, wie sie Hohlweg erscheint.

6. Die mit Hohlweg entstandene Diskussion rechtfertigt in eindrucksvoller Weise die von Behrens, Heubner, Koll und Külz aufgestellte und von Koll und Külz nachdrücklich wiederholte Forderung nach einer Erweiterung und Präzisierung der den Oestrushormon-Standardpräparaten beigegebenen methodischen Richtlinien. Darüber hinaus zeigt sie, daß eine Nachprüfung der Deklarationen von Handelspräparaten, wie sie seit einer Reihe von Jahren durch die Deutsche Pharmakologische Gesellschaft im Auftrage des Reichsgesundheitsamtes ausgeführt werden, ihre volle Berechtigung hat.

Berichtigung

zur Arbeit „Zur Frage der Tachyphylaxie“ von H. G. Rietschel, Naunyn-Schmiedebergs Archiv **193**, 454 (1939).

Da der Verfasser die Korrekturen zu obiger Arbeit nicht selbst vornehmen konnte, ist ein Fehler in der Reihenfolge der Abb. 1 und 2 unterlaufen. Diese beiden Abbildungen müssen samt Text vertauscht werden.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Über akute Ferro-Eisenwirkungen.

Von

W. Straub und **Kristinn Stefánsson.**

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Oktober 1939.)

Die hier mitzuteilenden Untersuchungen schließen eigentlich an die historisch ersten experimentellen Eisenuntersuchungen von Hans Meyer und Fr. Williams[1] aus dem Jahre 1881 an.

Meyer und Williams untersuchten die akute Eisenvergiftung nach einmaliger intravenöser Injektion des komplexen Ferri-Tartrat-Natriums, das sie auffallenderweise, und entgegen den sonstigen damaligen Anschauungen von der Harmlosigkeit dieses physiologisch so wichtigen Metalles, hochwirksam fanden. Sie stellten fest, daß ab 0,02 g pro Kilogramm Kaninchen die tödliche Wirkung beginnt. Der Tod erfolgt sehr langsam bei Grenzdosen nach 8 oder mehr Stunden im Gefolge eines starken Gefäßkollapses, der als solcher erkannt wurde, weil im Blutdruckversuch die faradische Halsmarkreizung erfolglos blieb. Daneben bestand starke azidotische Blutveränderung, der Kohlensäuregehalt des Blutes sank auf tiefste Werte, ohne daß gleichzeitig der Sauerstoffgehalt verändert worden wäre.

Meyer und Williams weisen auf die auffallende Ähnlichkeit dieser akuten Eisenvergiftung mit der vorher von R. Böhm[2] studierten Arsenwirkung hin. In der Zwischenzeit hat sich das pharmakologische Interesse hauptsächlich auf die Ferro-Ionverbindungen konzentriert, weil allein diese physiologisch und therapeutisch bedeutsam zu sein scheinen (Starkenstein[3], Heubner[4]). Die den Untersuchungen von Meyer und Williams über Ferri-Eisen analogen Untersuchungen über die akute Wirksamkeit des Ferro-Ions ist von Hendrysch[5] (unter Starkenstein) in Angriff genommen worden. Er fand die Toxizität von Ferro-Ion von derselben Größenordnung wie Meyer und Williams bei ihrem Ferrikomplex. Die Erscheinungen der akuten Vergiftung nennt er narkoseartig, wie nach Magnesium. Diese Wirkung soll nach Starkenstein[3] sogar von Calcium antagonisiert werden. Der Blutdruck sinkt. Der Verlauf ist ebenfalls schleppend.

[1] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **13**, 70 (1881). — [2] Böhm, R.: Ebenda **2**, 89 (1874). — [3] Starkenstein: Ebenda **118**, 131 (1926). — [4] Heubner: Z. ärztl. Fortbild. 1926, S. 655ff. — [5] Hendrysch: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **161**, 422 (1931).

Eigene Versuche.

Nach den Angaben von Hendrysch bestehen jedenfalls am Blutdruck für Ferro-Eisen Konzentrationswirkungsbedingungen. Auch soll die Wirkung einmaliger Teildosen rasch ausgeglichen werden, ohne daß der tödliche Effekt der Gesamtmengen ausbliebe. Deshalb haben wir in diesen Untersuchungen nicht Einzelinjektionen, sondern Dauerinfusionen der Ferrosalzlösungen mit der Heuwing-Spritze[6] vorgenommen, in der Erwartung, wenigstens für die Dauer der Infusionen annähernd konstante Konzentrationen im Blute zu unterhalten.

Die verwendeten Ferrolösungen wurden jeweils frei von Ferri-Ionbeimengungen (negative Rhodanprobe) durch Auflösen von Ferrum reductum in Salzsäure bzw. Schwefelsäure hergestellt. Wir untersuchten auch das Verhalten des Bicarbonats, das interessant ist, weil es als der wirksame Bestandteil der Eisenquellen gilt, und außerdem bei seiner Autoxydation überhaupt kein wasserlösliches Ferri-Ion entstehen kann. Das Ferrobicarbonat wurde gewonnen durch Auflösen von Ferrum reductum durch Kohlensäure unter Druck in Wasser. Man erhält dadurch eine etwa 0,1 %ige Lösung, also weit konzentrierter als irgendein eisenhaltiges Mineralwasser.

Wir bestimmten zunächst die tödlichen Dosen von Einzelinjektionen (s. Tabelle 1) in bezug auf die Wirkungsdauer.

Tabelle 1.

Tier kg	Fe-Lösung	Fe-Konzentration %	Injektionsmenge ccm	Fe^{++} pro kg	Dauer der Wirkung bei Injektion. Tod
2,52	$FeCl_2$	0,5	5,05	10 mg	Keine Wirkung
2,40	„	0,5	14,4	30 „	Tod nach 8 Stunden
3,08	$FeSO_4$	2,4	9,0	70 „	Tod sofort
2,77	„	0,4	3,17	10 „	Keine Wirkung
2,48	„	1,2	4,14	20 „	Tod nach 3 Stunden
2,55	$Fe(HCO_3)_2$	0,1	12,75	5 „	Keine Wirkung
2,52	„	0,1	25,2	10 „	Tod nach 3 Stunden

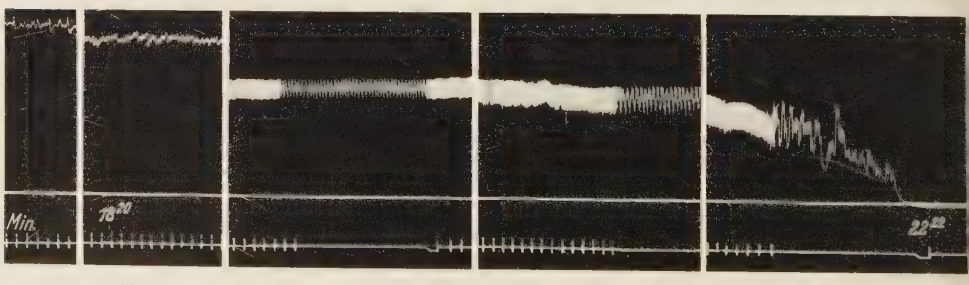


Abb. 1. Fünf Stadien aus einem Blutdruckversuch mit Ferrosulfat am Kaninchen.

Im Gegensatz zur Größe der einfach tödlichen Dosis von 20 mg/kg mit Tod nach 8 Stunden bei Injektion zeigt sich, daß sehr große Mengen von Ferro-Ion im Tier untergebracht werden müssen, um den Tod

[6] Straub, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 456 (1937).

bei laufender Infusion zu veranlassen, um so größere, je verdünnter die Konzentration des Eisens ist. Es müssen rund 100 mg/kg sein, um nach einigen Minuten akut zu töten.

Verfolgt man nun den Blutdruck während einer tödlichen Dauerinfusion, so ergibt sich das Bild der Abb. 1, d. h. es tritt eine langsame Blutdrucksenkung ein mit zunehmenden Pulsamplituden, also wohl eine einseitige Gefäßwirkung bei unveränderter Herzkraft, ganz wie bei der akuten Arsenikwirkung, wie dies von Meyer und Williams für die Wirkung des Ferrikomplexes angenommen wurde. Meyer und Williams analysierten den Vasomotorenzustand durch die faradische Halsmarkreizung. Wir prüften das gleiche durch die Reizbarkeit gegen intravenöse Adrenalininjektionen.

Die Abb. 2 entstammt dem entscheidenden Versuch dieser Reihe. Er wurde in der Art angestellt, daß dem urethannarkotisierten Kaninchen intravenös Ferrosulfat infundiert wurde. In diesen laufenden Eisenzustand des Blutes, definiert durch die Infusion von 1,45 mg/kg/min. Ferro-Ion wurde die Wirksamkeit von bis zu 100 γ Adrenalin völlig aufgehoben, während vorher 50 γ Adrenalin eine sehr deutliche und anhaltende Wirkung verursachten. Nach Absetzen der Eiseninfusion kehrte die Adrenalinempfindlichkeit sehr bald wieder und war nach wenigen Minuten wieder normal. Wenn man eine Adrenalininjektion vornimmt, und auf der Höhe der Blutdruckwirkung die Eiseninfusion einbrechen läßt, fällt der Überdruck selbst von seinem Maximum mit großer Geschwindigkeit bis zu dem zugehörigen tiefen Eisenblutdruck ab. Der Versuch wird noch eindringlicher, wenn man ihn am tiefen Blutdruck einer Rückenmarkskatze anstellt (Abb. 3). Es ergab sich also, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ferro-Ion das Adrenalin unwirksam wird, so wie bei Meyer und Williams beim Ferrikomplex die elektrische Halsmarkreizung unwirksam wurde. Für die Deutung des Resultats könnte man vielleicht daran denken, daß das Ferrosalz im Blute Ferrisalz wird, und dieses dann in der üblichen Weise, wie im Reagensglas das Adrenalin oxydiert und unwirksam macht. Abgesehen davon, daß allerlei Tatsachen der Blutchemie die Annahme nicht fundieren, muß darauf hingewiesen werden, daß die gleiche Wirkung auch bei Infusion von Ferrobicarbonat auftritt. Bei der Autoxydation von Ferrobicarbonat entsteht aber kein lösliches Ferri-Ion. Versetzt man bekannte Adrenalinlösungen mit frischem Blut im Reagensglas und injiziert sie dann, so tritt keine Änderung der Blutdruckwirkung des Adrenalins ein.

Es wäre denkbar, daß bei dem bisher besprochenen Adrenalin-Eisen-effekt das Eigenadrenalin des Tieres eine Rolle spielt. Deswegen haben wir Versuche nach doppelseitiger Nebennierenentfernung am Kaninchen angestellt (Abb. 4). Nachdem der unmittelbar nach der Operation stark gesunkene Blutdruck sich wieder auf ein konstantes Niveau gehoben hatte, wurde er weiterhin durch eine Adrenalin-Dauerinfusion zum konstanten Überdruck gesteigert. In diesen Adrenalinüberdruck hinein erfolgte dann von der anderen Vene her und mit einer anderen Spritze bei laufender

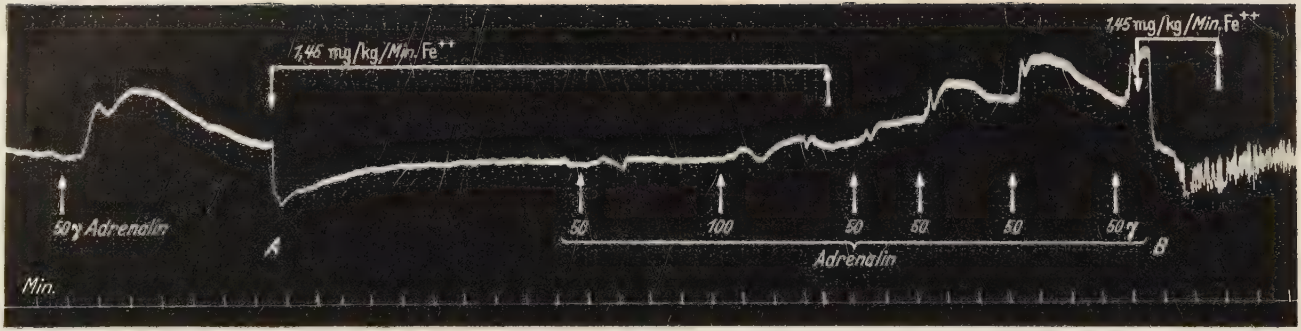


Abb. 2. Kaninchenblutdruck: *A* Unter Eiseninfusion verschwindet die Adrenalinwirkung. *B* Bestehende Adrenalinwirkung wird durch Eiseninfusion unterbrochen.

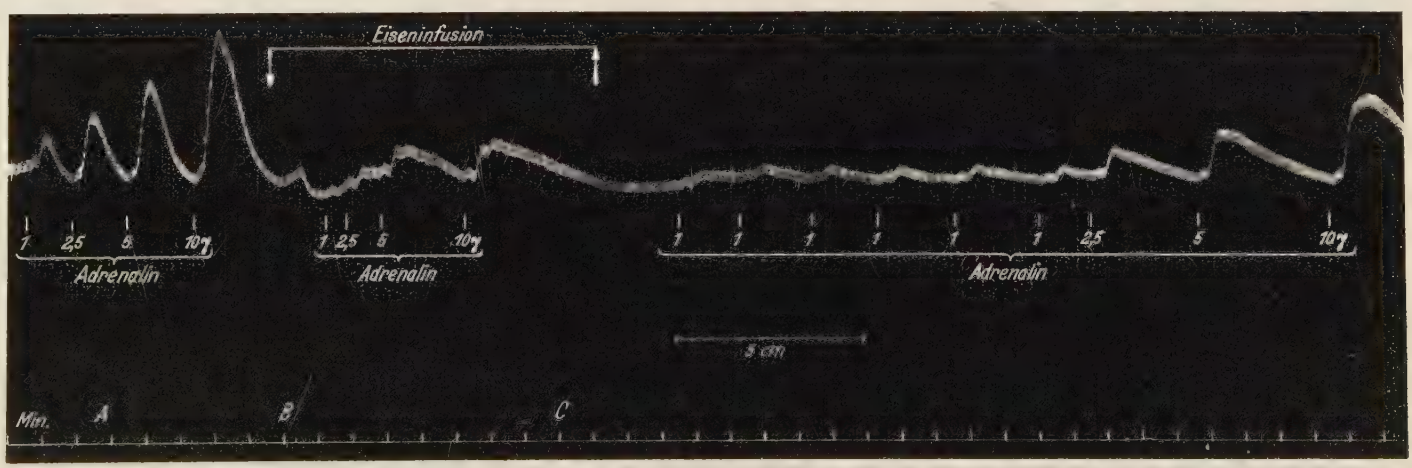


Abb. 3. Blutdruck der Rückenmarkskatze 40 mm Hg. *A—B*: Eichung von Adrenalininjektionen. *B—C*: Infusion von 0,8 mg/kg/min Fe^{++}; ab *C*: Infusion abgestellt und Erholung.

Adrenalininfusion eine Eiseninfusion. Sie wirkte gesetzmäßig blutdrucksenkend, und insbesondere erfolgte nach ihrer Absetzung der Wiederanstieg zum Adrenalindruck in gleicher Geschwindigkeit wie am Normal-

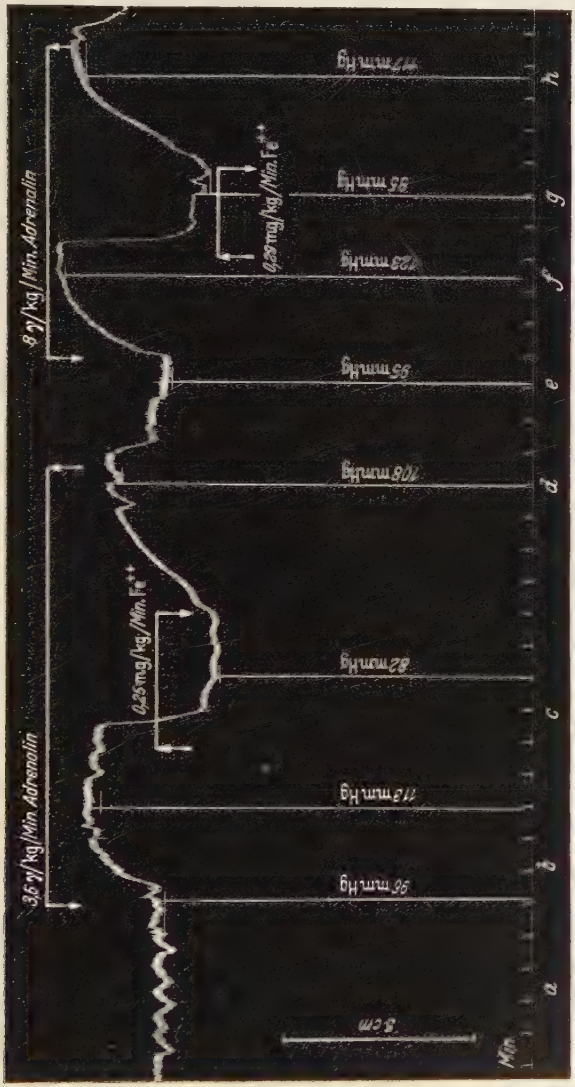


Abb. 4. Kaninchen, beiderseitige Nebennierenexstirpation.
a) Normalzustand, Blutdruck 96 mm Hg.
b) Infusion von Adrenalin 3,6 γ/kg/min. Blutdruck steigt auf 113 mm Hg.
c) Infusion von Fe^{++} 0,25 mg/kg/min. Blutdruck sinkt auf 82 mm Hg.
d) Eiseninfusion abgesetzt. Blutdruck steigt auf 108 mm Hg.
e) Adrenalininfusion abgesetzt, Blutdruck sinkt auf 95 mm Hg.
f) Infusion von Adrenalin 8,0 γ/kg/min. Blutdruck steigt auf 123 mm Hg.
g) Infusion von Eisen 0,29 mg/kg/min. Blutdruck sinkt auf 85 mm Hg.
h) Infusion von Eisen abgesetzt. Blutdruck steigt auf 117 mm Hg.

tier. Dieser Wiederanstieg kann also nicht durch etwa aus den Nebennieren sezerniertes Ersatzadrenalin bedingt sein.

Die ganzen Reaktionen scheinen sich also nicht zwischen Eisen und Adrenalin abzuspielen, sondern am Erfolgsorgan, den Gefäßen.

Weitere Versuche dienten der Empfindlichkeit der hier gefundenen Adrenalin-Auslöschwirkung. Es wurde die Größe der Ferroinfusionen er

mittelt, die als Schwellenwert gelten können. Dazu wurden im Blutdruckversuch des Kaninchens Eichungen mit sehr geringen Konzentrationen von Adrenalin vorgenommen, und dann deren Wirksamkeit während der Dauerinfusion des Ferroeisens geprüft.

Es zeigte sich, daß eine Konzentration von 0,010 mg/kg/min Ferro-Eisen wirkungslos ist, also den Adrenalineffekt von 1 γ Adrenalin nicht

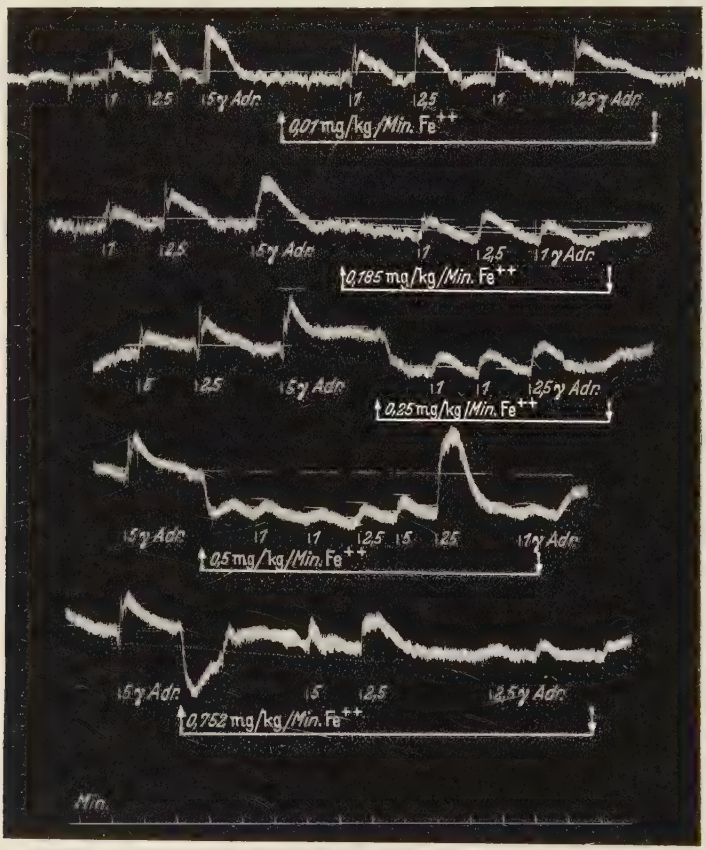


Abb. 5.
Blutdruck des Kaninchens. Ermittlung des Schwellenwertes für die Adrenalinauslöschreaktion

auslöscht. 0,185 mg/kg/min sind deutlich wirksam. Weitere Steigerung der Konzentration führt zu gesteigertem Auslöscheffekt. Der Schwellenwert der Eisenkonzentration liegt, wie aus anderen Versuchen ermittelt, bei etwa 0,05 mg/kg/min. In absolute Werte umgerechnet, bedeutet das für das Kaninchen von 2,5 kg 7,5 mg/Std., also eine Menge, die weit entfernt ist von der tödlichen Minimaldosis bei einmaliger Injektion (Abb. 5).

Es ist bemerkenswert, daß der Adrenalin-Auslöscheffekt solch kleiner Eisenkonzentrationen sehr rasch vorübergeht. Selbst bei 0,752 mg/kg/min,

die während 12 Sekunden infundiert wurden, war 15 Sekunden nach Absetzen der Infusion der Auslöscheffekt abgeklungen, woraus man wohl schließen darf, daß die zu ihm führende Eisenwirkung sehr flüchtiger Natur ist, das Eisen also die Blutbahn sehr rasch verläßt. Die Kurven der Abb. 5 sind mit Ferrobicarbonat gewonnen. Es besteht aber kein Unterschied zwischen Ferrobicarbonat und den anderen untersuchten Ferrosalzen, Ferrochlorid und Ferrosufat. Größere Mengen von Eisen sind allerdings bei einmaliger Injektion sehr viel länger nachweisbar (vgl. Tabelle 2).

Aus dem Bisherigen hat sich ergeben, daß die Auslöschwirkung von Eisen gegen Adrenalinwirkung in vivo eine äußerst empfindliche Reaktion ist, und es lag nahe, mit dieser Reaktion pharmakologische Eisenfragen zu bearbeiten.

Tabelle 2. Dauer der Nachweisbarkeit nach einmaliger intravenöser Injektion.

	mg/kg	Dauer der Nachweisbarkeit
$FeCl_2$	15,8	7 Minuten
$FeSO_4$	2,38	3 „
$Fe(HCO_3)_2$	2,38	3 „
„	2,59	4 „
„	4,7	8 „
„	9,4	9 „

a) Resorption.

Daß die Ferrosalze überhaupt vom Darm aus resorbierbar sind, ist längst schon mit anderen Mitteln erwiesen. Ohne auf weitere Einzelheiten einzugehen, sei nur erwähnt, daß es uns gelang nachzuweisen, daß mit der Adrenalin-Auslöschreaktion ein positiver Effekt erzielt wird, wenn man die Eisensalzlösungen unmittelbar in das Dünndarmlumen einbringt, und zwar besteht kein Unterschied zwischen den drei untersuchten anorganischen Ferrosalzen. Die Intensität der Resorption scheint nicht sehr groß zu sein, auch nicht sehr lange anhaltend.

b) Parenterale Einverleibung.

Die zu prüfenden Ferrosalzlösungen wurden an zwei bis vier Stellen intramuskulär injiziert. Schon nach kurzer Zeit wurde die Adrenalin-Auslöschreaktion deutlich, blieb aber nur kurze Zeit bestehen (Abb. 6).

Abb. 6. Intramuskuläre Resorption von Ferrobicarbonat. a) Eichungen. b) Nach der intramuskulären Injektion.

Dabei soll nicht gesagt sein, daß die Resorption tatsächlich nur so kurz bestand, sondern nur im Umfange der Empfindlichkeit der Auslöschreaktion.

c) Leberfragen.

Wenn man in eine Mesenterialvene hinein, die also leberwärts gerichtet ist, Eisen injiziert, so tritt bei den Dosen, die bei Injektionen in die Vena jugularis schon wirksam sind, keine Reaktion ein. Das Eisen ist also nicht von der Mesenterialvene aus in den allgemeinen Kreislauf gelangt. Erst wenn man nacheinander sechs derartige Mesenterialveneninjektionen macht, ist das Eisen im allgemeinen Kreislauf zu finden, d. h. also, die Leber speichert, wie natürlich schon bekannt, aber hier in besonderer Weise nachweisbar, das Eisen.

Nach geläufigen Vorstellungen nimmt man an, daß Eisen in der Leber vom Reticulo-Endothel abgefangen wird, dieses Endothel also die Eisenresorption zu blockieren imstande ist. Blockade des Reticulo-Endothels ist durch mancherlei Stoffe möglich, so auch durch Methylenblau. Wir haben von der Mesenterialvene aus zunächst ein Quantum Methylenblau durch die Leber geschickt und dann die Eiseninjektionen vorgenommen. In diesem Falle, der allerdings noch weitere Untersuchungen verlangen würde, gelangte schon Eisen der ersten Injektion trotz Leberpassage in den allgemeinen Kreislauf.

Zusammenfassung.

1. Die im Laufe einer Dauerinfusion von Ferrosalzlösung am Kaninchen eintretende Blutdrucksenkung ist vasomotorischer Natur.

2. Es besteht ein funktioneller Antagonismus zwischen Ferro-Ionlösungen und Adrenalin.

3. Die Auslöschung der Adrenalinwirkung durch Ferro-Ion ist eine sehr feine Reaktion, geeignet zum Studium von Fragen des Eisenhaushaltes.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Über die Resorption von Ferrosalzen, speziell des Ferrobicarbonats.

Von

August Amann.

(Eingegangen am 19. September 1939.)

In der vorhergehenden Arbeit von W. Straub und K. Stefánsson[1] wurde gezeigt, daß die Adrenalinwirkung am Blutdruck aufgehoben wird, wenn Ferroion ins Blut gebracht wird. Die Autoren benutzten die Reaktion zum Nachweis der Resorption von Ferroeisen aus dem Darm. Die vorliegende Untersuchung soll die chemische Ergänzung zu den obigen Resorptionsversuchen bilden.

Versuche.

Die zu prüfenden Lösungen wurden dem hungernden Kaninchen in den Magen gebracht. Den Tieren wurde von Zeit zu Zeit Blut zur chemischen Untersuchung entnommen. Schließlich wurden sie getötet, die Leber von der Pfortader her mit Kochsalzlösung ausgewaschen und dann zur Analyse verwendet.

Die Eisenanalyse des Blutes wurde nach der Methode von Rappaport und Hohenberg[2] durchgeführt, bei der mit 0,1 ccm Blut ausreichend genaue Werte erhalten werden. Die Methode wurde in unwesentlicher Weise etwas vereinfacht. Sie war schließlich die folgende:

Nach feuchter Veraschung des Blutes mit Perhydrol-Schwefelsäure und Überführung der Veraschungsflüssigkeit in den Parnasschen Apparat wurde das durch die äquivalente Menge Eisen freiwerdende Jod in 10%iger Pottaschelösung aufgefangen. Nach beendeter Destillation wurde die Vorlage mit 50%iger Schwefelsäure angesäuert und einige Tropfen einer frischen, wässerigen Bromlösung zugegeben. Nach 2 Minuten Stehenlassen, kurzes Aufkochen zur Entfernung des überschüssigen Broms. Die heiße Lösung wurde rasch abgekühlt und mit n/200 Thiosulfat in üblicher Weise titriert. Ich habe diese Vereinfachung der Methode durch ausreichende Probeanalysen auf ihre Brauchbarkeit geprüft, und eine Fehlergrenze von $\pm$ 5% festgestellt. Die Abänderung ist somit für physiologische Untersuchungen brauchbar. Ihr Vorteil fällt vor allem bei Serienanalysen als Zeitersparnis bedeutend ins Gewicht.

Als Eisensalze wurde das Ferrosulfat, Ferrochlorid sowie das Ferrobicarbonat verwendet. Sie wurden frisch hergestellt durch Auflösen von Ferrum reductum in den entsprechenden Säuren. Das Ferrobicarbonat wurde durch Auflösen von Ferrum reductum in kohlensäurehaltigem Wasser

[1] Straub u. Stefánsson: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 269 (1940). — [2] Rappaport: Klin. Wschr. **1933**, S. 1810, Jahrg. 12.

unter Druck von nicht ganz 2 Atm. hergestellt. Es ist auf diese Weise leicht möglich, Ferrobicarbonatlösungen von 0.15% Fe^{++}-Gehalt zu bekommen. Solche Lösungen sind bei Luftabschluß gut haltbar. Erst nach Abdunsten der überschüssigen Kohlensäure und leichtem Erwärmen fällt etwas Monocarbonat als unlöslicher weißer Körper aus.

Das Ferrobicarbonat hat besonders interessiert, weil es der Eisenbestandteil der natürlichen Stahlquellen ist und in obiger Form in höherer Konzentration verwendet werden kann. Die natürlichen Eisenquellen haben als höchsten Gehalt 0.050 g Fe^{++} im Liter. Sie sind durchschnittlich etwa drei- bis fünfmal weniger konzentriert als die nach obiger Vorschrift hergestellte Ferrobicarbonatlösung. In seinen chemischen Eigenschaften unterscheidet sich das Ferrobicarbonat von den anderen zwei Ferrosalzen dadurch, daß bei seiner Autoxydation bloß unlösliches Ferrihydroxyd entsteht und ausfällt, also kein lösliches Ferri-Ion entsteht. Die Rhodanreaktion auf Ferri-Ion bleibt negativ. Ferrobicarbonat zerlegt Wasserstoffsuperoxyd.

Zum Vergleich mit den Ferrosalzen wurden die Ferrisalze des Chlorids und Sulfats, sowie einige Komplexe herangezogen. Die Resultate der Untersuchung sind in folgender Tabelle 1 zusammengestellt: Jede Zahl

Tabelle 1.

Eisensalz	Fe^{++}-Gehalt	Normalblut-eisen	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.	Nach 3 Std.	Eisengehalt der Trockenleber
	mg	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%
Ferrobicarbonat	178	33,5	36,2	45,8	41,0	45,5
Ferrochlorid....	178	36,6	37,3	46,6	34,7	73,1
Ferrosulfat	178	33,6	46,2	61,2	58,1	57,3
Ferrisulfat	150	47,1	48,5	47,5	46,1	14,9
Ferrichlorid	150	34,9	34,9	34,0	40,0	15,3

ist der Mittelwert von zwei gut stimmenden Einzelanalysen. Der Umstand, daß kein lösliches Ferri-Ion bei der Autoxydation des Ferrobicarbonats entsteht, macht es auch zu einem die Schleimhäute des Magens nicht reizenden Eisenstoff, was für therapeutische Zwecke von Bedeutung sein kann*. Es ist anzunehmen, daß das resorbierte Eisen für die Dauer dieser Untersuchungen als Serumeisen zirkuliert und eine Änderung des Hämoglobineisens mindestens noch nicht stattfindet. Deshalb wurde nur das Totaleisen des Blutes bestimmt. Die Unterschiede der einzelnen Analysen wurden als Zuwachs des Serumeisens betrachtet. Es ergab sich bei den Analysen eine sichere Zunahme des Totalbluteisens nach 2 Stunden, die auch in der dritten Stunde noch sehr deutlich war und bis zu einem Maximum der Steigerung des Bluteisens von etwa 50% führte. Bemerkenswert ist eine starke etwa 100%ige Zunahme des Eisengehalts der Leber. (Den Eisengehalt der blutfreien Kaninchenleber bestimmte ich in mehreren Versuchen zu etwa

* Siehe darüber L. Heilmeyer u. K. Plötner: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena 1937.

25 mg% auf Trockensubstanz gerechnet.) Die beiden Ferrisalze Sulfat und Chlorid erwiesen sich bei analogen Versuchen als völlig unresorbierbar.

Bluteisen nach intravenöser Injektion.

In den Untersuchungen von W. Straub und Stefánsson[1] wurde die Eisenanwesenheit im Blute während einer Dauerinfusion ermittelt. Es interessiert aber auch zu wissen, wie lange das Eisen im Blutserum nach einer einmaligen Injektion erhalten bleibt. Deshalb habe ich auch Kaninchen einmalig eine sicher tödliche Dosis von Ferrosalz (30 mg) injiziert und alle Viertelstunden, im ganzen achtmal, Blut entnommen und auf Eisen untersucht. Bekanntlich wirken derartige letale Grenzdosen erst im Laufe von mindestens 8 Stunden tödlich. In meinen Versuchen (Tabelle 2) zeigte sich, daß die Zunahme des Bluteisens während der ganzen Beobachtungsdauer erhöht blieb. Ein merkliches Abwandern von Eisen in die Leber war aber zu konstatieren.

Tabelle 2.

Kaninchengewicht	Ferro-Salz	mg/kg	Injektionsmenge	Bluteisen									Leber-eisen
				Normal	15′	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	
kg			ccm	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %
2,5	$Fe(HCO_3)_2$	30	53,7	26,9	56,3	61,6	49,2	52,0	—	58,5	—	59,9	—
2,3	„	30	56,0	38,7	66,4	69,5	71,7	71,0	-	63,6	—	64,7	71,8
2,4	$FeCl_2$	30	10,0	37,3	66,9	60,8	56,4	58,2	—	59,2	—	59,2	69,4

Ferrobicarbonat.

Das Ferrobicarbonat erscheint als chemische Substanz besonders interessant. Es ist so gut resorbierbar wie die anderen beiden Ferrosalze, hat aber den Nachteil einer sehr raschen Autoxydierbarkeit. Ich habe versucht, durch Bildung eines Ferrokomplexes mit Weinsäure oder Citronensäure das Ferrobicarbonat vor der Autoxydation zu schützen. Chemisch gelingt das zum Teil. Aber die Untersuchung der Resorbierbarkeit des offenbar gebildeten Ferrokomplexes ergab dessen Unresorbierbarkeit (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Eisenkomplexsalz mit	Ferro-Gehalt	Normal-bluteisen	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.	Nach 3 Std.	Eisengehalt der Trockenleber
	mg	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %
Weinsäure	112	35,4	36,0	40,1	40,1	22,1
Citronensäure ..	112	37,4	36,1	39,6	36,1	15,9
Brenzcatechin ..	112	43,3	41,0	40,5	42,9	41,3

Als unresorbierbar erwies sich auch das Ferrobicarbonat unter Zusatz von Brenzcatechin. Dazu ist folgendes zu bemerken: In den Untersuchungen von W. Straub und K. Stefánsson[1] hat sich herausgestellt, daß in vitro Adrenalinlösungen durch Zusatz von Ferrobicarbonat und anderen Ferrosalzen intensiv indigoblau verfärbt werden. In vivo wird bekanntlich die Adrenalinwirkung durch Ferrosalze aufgehoben. Dieselbe Färbung wie Adrenalin + Ferrosalze gibt auch das Brenzcatechin. Deshalb wurde auch dessen vermutlicher $Fe^{\cdots}$-Komplex auf seine Resorbierbarkeit geprüft. Wie die Tabelle 3 zeigt, verschwindet die Resorbierbarkeit des Ferrobicarbonats in seinem Brenzcatechinkomplex.

Zusammenfassung.

1. Die enterale Resorbierbarkeit der in der Arbeit von W. Straub und K. Stefánsson[1] benutzten anorganischen Ferrosalzverbindungen wird chemisch untersucht.

2. Die chemischen Untersuchungen bestätigen die mit der Adrenalinauslöschmethode gefundenen Ergebnisse, insbesondere auch für das Ferrobicarbonat.

3. Durch Komplexbildung mit organischen Säuren wird die Resorbierbarkeit aufgehoben.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Über den Komplex: Ferro-Eisen/Adrenalin*.

Von

Günther Vogeler.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. November 1939.)

In einer vorhergehenden Arbeit zeigten W. Straub und K. Stefánsson [1], daß in vivo die Blutdruckwirkung des Adrenalins durch Injektion von Ferro-Ion aufgehoben werden kann und solange verschwindet, als Ferro-Ion im Blute kreist. Die Abb. 4 der Arbeit von W. Straub und K. Stefánsson zeigt die Blutdruckhebung, die durch Dauerinfusion von 3.6 bzw. 8,0 γ/kg/Min. Adrenalin erzeugt wird. Wenn in diese Blutdrucksteigerung hinein Ferroeisen von einer anderen Vene her infundiert wird, so sinkt der Blutdruck, um nach Absetzen der Eiseninfusion und laufender Adrenalindauerinfusion rasch auf den zugehörigen Adrenalinwert wieder anzusteigen. Die Latenz der beiden Eingriffe des Einbruchs und des Verschwindens des Ferro-Ionstroms ist sehr kurz, und durch die Herstellung der neuen Gleichgewichte genügend geklärt. Die naheliegende Erklärung der Erscheinung, daß das Adrenalin einem aus dem Ferro-Ion entstandenen Ferri-Ion im Blute zum Opfer gefallen wäre, erwies sich als nicht haltbar, da gezeigt wurde, daß das Ferro-Ion lähmend am Erfolgsorgan angreift, der Antagonismus Ferro-Ion Adrenalin demnach kein chemischer, sondern ein funktioneller ist. Es ist bekannt, daß wohl eine chemische Reaktion zwischen Ferri-Ion und Adrenalin besteht, die rasch über einen grüngefärbten Komplex zur Zerstörung des Adrenalins führt.

Von W. Straub und K. Stefánsson wurde beobachtet (nicht veröffentlicht), daß Ferri-Ion-freie Ferrosalzlösungen Adrenalin- wie auch Brenzcatechinlösungen tief indigoblau verfärben. Die Farbe bleibt beim Adrenalin viel länger beständig als die Ferri-Ion Adrenalin-Grünfärbung und verschwindet erst langsam durch Autoxydation des Eisens[2].

Es zeigte sich, daß der blaue Komplex am reinsten entsteht und am haltbarsten ist, wenn man das Ferro-Ion in Form des Ferrobicarbonats

* D 19.

[1] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 269 (1940).

[2] Anmerkung. Die Reaktion ist von J. H. Barker, Eastland und Evers, Biochem. J. **26**, 2119 (1932), schon erwähnt. Die Autoren schreiben, daß die Blaureaktion eintritt, wenn Ferrosulfat unter hinreichender Neutralisation mit Natriumphosphat versetzt wird. Die blaue Farbe wäre ziemlich stabil, erträgt aber keinen Alkaliüberschuß. Zur Adrenalinmessung wäre sie nicht geeignet.

verwendet, bei dessen Autoxydation bekanntlich kein gelöstes Ferri-Ion entstehen kann.

Da alle Versuche einer Isolierung des Ferro Adrenalinkomplexes fehlschlugen, wurde seine chemische Zusammensetzung hinsichtlich der hier interessierenden Punkte photometrisch untersucht. Es wurde die Extinktion des Komplexes ermittelt, und zwar in Lösungen, die in 100 ccm $^1/_{100}$ bis $^{16}/_{100}$ Millimol Komplex enthielten. Für die Auswertung wurde das Beersche Gesetz als erfüllt angenommen. Die Extinktion Abb. 1 hat ihr Maximum,

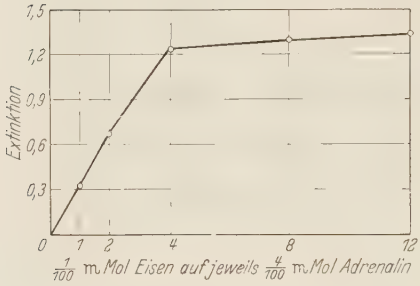


Abb. 1.

wenn gleiche Anzahl von Molen des Adrenalins und Eisens verwendet werden. Sie ändert sich weder auf Zusatz von Eisen, noch auf Zusatz von Adrenalin allein. Die Messungen wurden 5 Minuten nach der Herstellung der Lösung ausgeführt. Der Komplex scheint nur in wässeriger Lösung zu existieren.

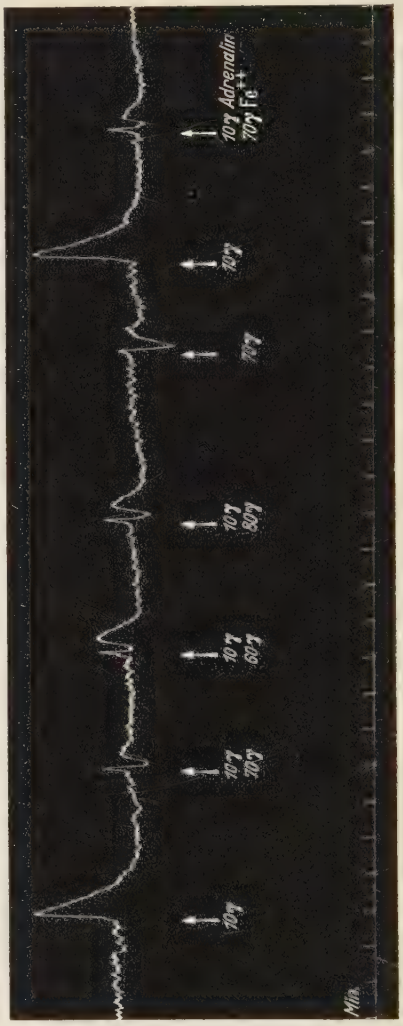


Abb. 2. Wirkungen verschiedener Mischungsverhältnisse von Ferrobicarbonat und Adrenalin am Blutdruck.

Prüfungen am Blutdruck.

Mit diesem Komplex wurden nun die Prüfungen am Blutdruck durchgeführt.

Decerebrierten Kaninchen wurden die verschiedenen Mischungsverhältnisse von Adrenalin und Ferrobicarbonat in isotonischer Lösung und von einem p_H von 6,6 rasch intravenös injiziert. Es wurden jeweils

2 ccm verwendet. Die Mischungen der beiden Komplexbestandteile wurden stets eine halbe Minute vor der Injektion hergestellt. Als Intensität der Adrenalinwirkung wurde die einer Injektion von 10 γ konstant beibehalten. Variiert wurde die Menge des Ferro-Ions. Zum Verständnis der Kurve ist zu sagen, daß die Wirkung von 10 γ Adrenalin eine stets gleichartige, nicht sehr hochgehende Blutdrucksteigerung ist. Die Wirkung von Einzelinjektionen des Ferrosalzes ist je nach der Dosis eine kurzdauernde, steil einsetzende und langsam wieder verschwindende Senkung des Blutdrucks, die auch bei größten Dosen nicht über einige Millimeter Quecksilber hinausgeht. Siehe die Abb. 2.

Es ergab sich zunächst die Tatsache, daß der Komplex (1 : 1) fast seine volle Adrenalinwirkung hat. Bis zur völligen Aufhebung der Adrenalinwirkung mußten 20 bis 25 Moleküle Ferroeisen auf 1 Molekül Adrenalin verwendet werden. In Gammawerten ausgedrückt besteht das Verhältnis 1 : 7 oder 10 γ Adrenalinwirkung wird von 70 γ Ferroeisen aufgehoben. Das Verhältnis 1 : 7 ist bis zu einem gewissen Grade konstant und unabhängig von der Adrenalinmenge, so z. B. wird die Wirkung von 20 γ Adrenalin von 120 γ Eisen aufgehoben. Siehe Abb. 3.

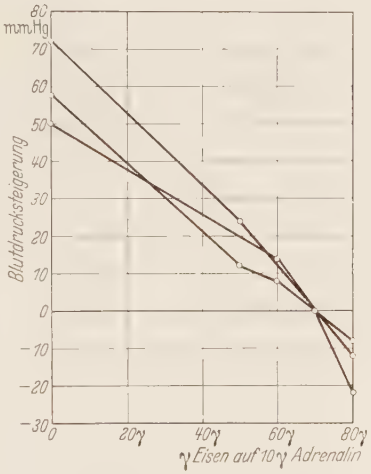


Abb. 3. Aufhebung der Adrenalinwirkung durch verschiedene Mengen $Fe^{\cdot\cdot}$. Versuche an 3 Kaninchen.

Für die Deutung des Antagonismus Adrenalin Ferro-Ion am Blutdruck ergibt sich aus diesen Versuchen, daß ein Unwirksamwerden des Adrenalins auf chemischem Wege durch Komplexbildung kaum in Frage kommt, daß vielmehr die frühere Annahme eines funktionellen Antagonismus mit Angriffspunkt am Erfolgsorgan, dem Blutgefäß, auch in chemischer Hinsicht das Wahrscheinliche ist.

Zusammenfassung.

1. Adrenalin und Ferroeisen bilden einen chemischen Komplex von intensiv indigoblauer Farbe.

2. Dieser Komplex hat beinahe volle Adrenalinwirkung.

3. Eine Mischung von 1 Mol Adrenalin und 23 Mol $Fe^{\cdot\cdot}$ hat keine Adrenalinwirkung mehr. Mengenmäßig wird die Wirkung von 10 γ Adrenalin durch 70 γ $Fe^{\cdot\cdot}$ ausgelöscht.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Graz. (Vorstand: Prof. Dr. W. Berger.)

Über die Herkunft stofflicher Blutveränderungen bei Nebenniereninsuffizienz.

Von

O. Riml.

(Eingegangen am 11. November 1939.)

Die Diagnose des Morbus Addison, der Nebenniereninsuffizienz des Menschen, stützte sich bis vor kurzem fast ausschließlich auf die klinischen Erscheinungen. Es ist daher in der Natur der Sache gelegen, daß einerseits leichte Fälle, sogenannte Addisonismen, oft mißdeutet werden, andererseits ganz akut eintretende Nebenniereninsuffizienzen, bei welchen es infolge der Kürze der Entstehungszeit nicht zu den typischen Erscheinungen kommt, falsch diagnostiziert werden.

Es setzte daher in den letzten Jahren das Bestreben ein, aus Stoffwechselveränderungen im Blute auf das Vorliegen und auf den Grad der Nebenniereninsuffizienz zu schließen. Hier sind vor allem die Untersuchungen von Loeb und Mitarbeitern zu nennen, welche bei Rindeninsuffizienz Störungen im Elektrolyt-Wasserhaushalt fanden, und zwar in dem Sinne, als der Kaliumspiegel im Blute steigt, der Natrium- und Chlorspiegel sinkt. Diese Erscheinungen sind durch Cortingabe reversibel.

Die Veränderungen des Elektrolythaushaltes können, wie dies noch später dargelegt werden wird, als Folgeerscheinung des Rindenhormonmangels auf den Blutchemismus aufgefaßt werden.

Ausgehend von der Beobachtung von Langlois (1897), daß das Blut nebennierenloser Tiere für andere epinephrektomierte Tiere giftig ist, sowie von der Feststellung von Banting und Gairns (1926), daß die Injektion von Serum eines Hundes, der nach Nebennierenextirpation gestorben war, bei der Übertragung auf einen anderen gesunden Hund Diarrhoen, Erbrechen und 6—8 Stunden anhaltendes Unbehagen hervorrief, unternahm ich (1936) nochmals Übertragungsversuche von Seren nebennierenloser Tiere auf normale Tiere, unter gleichzeitiger Beobachtung der Nebennieren der Empfängertiere.

Daß die in den Versuchen von Banting und Gairns beschriebenen Erscheinungen durch eine vermehrte Kaliumzufuhr bedingt gewesen seien, ist unwahrscheinlich. Berechnet man die Blutmenge eines mittelgroßen Hundes mit ungefähr 1 Liter und werden jetzt 80 ccm Serum eines nebennierenlosen Hundes zugeführt, so kann maximal der Kaliumspiegel des normalen Hundes — ganz abgesehen von einer Abwanderung des Kaliums in die Gewebe des Spendertieres — von normalerweise 20 mg% auf 24,8 mg% steigen. Nach Zwemer und Truszkowski erreicht nämlich der Kaliumspiegel bei nebennierenlosen Tieren maximal das Dreifache der Norm; es sind also in 80 ccm Serum höchstens 48 mg Kalium enthalten. Zählt man

diese 48 mg zu den 200 im Blute des Empfängertieres schon befindlichen, so ergibt sich ein Wert von 248 mg, oder auf % umgerechnet der oben angegebene Wert von 24,8 mg%. Um aber mit Kalium Vergiftungserscheinungen auslösen zu können, muß der Kaliumspiegel nach Zwemer und Truszkowski durch längere Zeit auf dem 2- bis 3fachen der Norm gehalten werden, also zwischen 40 und 60 mg%.

Ich selbst habe 180—200 g schweren Meerschweinchen 50 mg Kalium, in Form von Kaliumchloridlösung gespritzt, also größenordnungsmäßig an Kalium die 100fache Menge dessen zugeführt, was in das Serum der Hunde der Versuche von Banting und Gairns übertragen wurde, ohne bei den Meerschweinchen oder an deren Nebennieren auch nur irgendeine Abweichung von der Norm beobachtet zu haben.

Es muß somit für den Versuchsausfall bei Banting und Gairns nach einer anderen Erklärung gesucht werden.

Bei meinen früher erwähnten Übertragungsversuchen wurde festgestellt, daß im Serum nebennierenloser Kaninchen ein dialysabler Stoff kreist. Sein Nachweis geschieht durch Übertragung des Serumdialysates nebennierenloser Kaninchen auf normale junge Meerschweinchen. Die so behandelten Testtiere zeigen in Übereinstimmung mit Langlois sowie mit Banting und Gairns abhängig von Konzentration und Menge des zugeführten Stoffes Allgemeinerscheinungen, nämlich Ermüdung bis Erschöpfung, manchmal sogar mit tödlichem Ausgang, außerdem aber auch Veränderungen an den Nebennieren, die sich in Organvergrößerung, Hyperämie und Veränderung der Lipoidverteilung in den Rindenzellen äußern. Durch gleichzeitige Cortingaben können die Allgemeinerscheinungen und die Nebennierenveränderungen gemildert bzw. behoben werden.

Im Serum Addisonkranker fand sich der gleiche Stoff. Seine Konzentration im Blute ist von der Schwere der Erkrankung des Addisonikers abhängig. Nach Cortinbehandlung des Addisonkranken ist der Stoff in seinem Serum nicht mehr nachweisbar. Auf Grund dieser Untersuchungen an Mensch und Tier wurde geschlossen, daß der Stoff 1. bei Nebenniereninsuffizienz entsteht, 2. aber seinerseits der Nebenniereninsuffizienz entgegenwirkt, indem er die Cortinsekretion anregt und auf sie regulierend einwirkt.

Die Brauchbarkeit dieser von mir angegebenen Methode zum Nachweis der Nebennierenrindeninsuffizienz beim Menschen wurde erst jüngst durch Molnar und Petranyi bestätigt.

In einer kürzlich erschienenen Mitteilung bezeichnet Laves den von mir bei Nebenniereninsuffizienz festgestellten Stoff als kaum notwendige Annahme. Hierzu möchte ich vor allem bemerken, daß das Vorhandensein dieses Stoffes keine bloße Annahme ist, sondern auf experimentellem Wege nachgewiesen wurde. Wie schon früher mitgeteilt wurde (L. Kongreß, Wiesbaden 1938) und nunmehr an Hand von Versuchen gezeigt werden soll, ist der bei Nebenniereninsuffizienz entstehende Stoff ein Spaltprodukt, der durch Cortin oder bei Anwesenheit von Cortin weiterverarbeitet wird. Bei Rindenhormonmangel sammelt sich demnach der Stoff im Blute an. Die An-

häufung dieser „Zwischenprodukte" im Blute gibt nun Laves doch zu, da doch „alle bisherigen Befunde darauf hinweisen", ebenso die dadurch bedingte Elektrolythaushaltstörung, ohne aber in diesem Zusammenhange auf meine Arbeiten zu verweisen. Ob ich nun von „nicht abgebautem Zwischenprodukt des Stoffwechsels" spreche, oder aber für dieses Zwischenprodukt den Namen Nebenniereninsuffizienzstoff gebrauche, ist ja für die von mir nachgewiesene Tatsache des Vorhandenseins eines solchen Stoffs (vielleicht auch Stoffgruppe) belanglos.

Eines der Kardinalsymptome der Nebennierenrindeninsuffizienz ist die Muskelschwäche. Muskelstoffwechsel und Nebenniere müssen daher in enger Beziehung zueinander stehen. Dies geht auch daraus hervor, daß nach intensiver Muskelarbeit eine Nebennierenvergrößerung feststellbar ist. Da sowohl durch angestrengte Muskelarbeit als auch durch Injektion von Serumdialysat epinephrektomierter Tiere und addisonkranker Menschen eine Nebennierenvergrößerung beim normalen Empfängertier hervorgerufen wird, war die Annahme berechtigt, daß die nach Muskelarbeit auftretende Nebennierenhypertrophie wahrscheinlich durch den gleichen Stoff, der sich im Serum Nebennierenloser ansammelt, ausgelöst wird, daß also der nach Muskelarbeit auftretenden Nebennierenvergrößerung ein humoraler Auslösungsmechanismus zugrunde liegt. Entsprechende eigene tierexperimentelle Versuche und Untersuchungen am Menschen, nämlich an Langstreckenläufern und Tetanuskranken im Krampfstadium, konnten erweisen, daß die Nebennierenhypertrophie nach Muskelarbeit durch einen in das Blut abgegebenen, die Nebennierenrinde zu erhöhter Tätigkeit anregenden Stoff hervorgerufen wird.

Man muß daher annehmen, daß der nach intensiver und langdauernder Muskelarbeit und bei Nebennierenlosigkeit im Blute nachweisbare Stoff ein Muskelstoffwechsel- bzw. -abbauprodukt ist, das zu seiner Paralysierung Rindenhormon braucht. Wenn diese Annahme zu Recht besteht, dann müßte es auch gelingen, durch einen Gewebsabbau, wie ihn die Autolyse darstellt, den die Nebennierenrinde anregenden Stoff im Autolysat zu erhalten.

Muskelautolysat. Ich habe daher Muskelautolyseversuche gemacht, und zwar unter folgender Versuchsanordnung:

Kaninchenmuskel von eben getöteten Tieren wurden durch die Fleischmaschine getrieben, gewogen, mit der gleichen Menge Seesand fein zerrieben, mit ebensoviel ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt als Kaninchenmuskel abgewogen worden waren. Die eine Hälfte dieser Kaninchenmuskelbreiemulsion wurde als Kontrolle in den Kühlschrank gebracht, die andere Hälfte zur Autolyse in den Brutschrank (37°) gestellt, nachdem beide Proben vorher mit Toluol überschichtet worden waren. Nach 12 Stunden wurden die Proben aus dem Kühl- bzw. Brutschrank herausgenommen, das Toluol abgegossen, die autolysierte und die Kontroll-Muskelbreiemulsion zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgehoben und dann jede gegen die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung auf der Schüttelmaschine dialysiert. Nach der Dialyse wurden zu beiden Dialysaten soviel

ccm halbprozentige Natriumbicarbonatlösung gegeben, als zur Neutralisation des sauer reagierenden Autolysatdialysats benötigt wurde. Bemerkt sei noch, daß bei der Autolyse eine geringe osmotische Hypertonie des Autolysats entstand, welche sich in einer Vermehrung der Flüssigkeitsmenge im Dialysator auf der Seite des Autolysats und in einer Verminderung derselben auf der Seite der Kochsalzlösung ausdrückte. Die Flüssigkeitsverschiebung betrug 5—10% und wurde zum Schluß durch entsprechenden Wasserzusatz ausgeglichen.

Die Prüfung der Dialysate erfolgte wie bei den früheren Versuchen an 150 bis 190 g schweren Meerschweinchen, denen das Dialysat i. p. gespritzt wurde. Soweit die Tiere nicht spontan eingingen, wurden sie 24 Stunden nach der Injektion getötet, die Nebennieren gewogen und makroskopisch und histologisch untersucht. Die Beurteilung der histologischen Schnitte erfolgte in der in früheren Arbeiten beschriebenen Weise [Z. klin. Med. **134**, 1 (1938)].

Das Ergebnis dreier gleichartig verlaufener Versuche ist in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Es geht daraus hervor, daß bei den Kontrolltieren eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens nicht feststellbar war, die Tiere waren dauernd munter, ihre Nebennierengewichte bewegten sich in normalen Grenzen. Histologisch war stellenweise eine ganz geringe Beeinflussung der Rindenzellen im Sinne einer gesteigerten Zelltätigkeit feststellbar. Im Gegensatz dazu zeigten die mit dem Muskelbrei-Autolysatdialysat gespritzten Tiere bald eine Störung ihres Wohlbefindens. Bei dem ersten Tier ging diese Störung bald wieder zurück, bei den anderen Tieren verstärkten sich die Vergiftungserscheinungen immer mehr. Innerhalb 18—20 Stunden trat der Tod ein. Die Nebennieren dieser beiden letzteren Tiere waren schon makroskopisch infolge der Hyperämie dunkelrot und beträchtlich vergrößert. Histologisch waren Zeichen stärkster Lipoidausschwemmung aus den Rindenzellen und Hyperämie der Kapillaren feststellbar. Bei dem einen Tier, bei welchem die Allgemeinerscheinungen relativ geringe waren, waren auch die Veränderungen an den Nebennieren nicht so stark ausgeprägt, sowohl was die Steigerung des Gewichts anlangt als auch die makroskopischen und histologischen Veränderungen betrifft.

Obwohl nun bei jedem Versuch die gleiche Dialysat-Autolysatmenge, nämlich 25 ccm, gespritzt worden war, erwies sich das Autolysat im ersten Versuch als weniger wirksam. Die Ursache dieser Erscheinung liegt, wie ich es dann bei den später zu erwähnenden Leberautolyseversuchen ebenfalls beobachten konnte, in der Art der Verarbeitung. Je feiner die Zerkleinerung des Organbreies vorgenommen wird, um so wirksamer ist das Autolysat. Somit ist der Ausgang des Versuchs abhängig von der Zubereitung des Autolysats.

Leberautolysat. Um nun zu sehen, ob die Bildung dieses Stoffes, welcher bei der Muskelautolyse entsteht, die beschriebenen Erscheinungen nach seiner Injektion am Tier hervorruft und zu den erwähnten Veränderungen der Nebennieren führt, nur für die Muskelzelle spezifisch ist, wurden die Autolyseversuche auch auf das Lebergewebe erstreckt.

Tabelle 1. Wirkung von Injektion von Muskelbreidialysat nach Behandlung im Kühlschrank bzw. Brutschrank (Autolyse) auf den Allgemeinzustand und die Nebennieren der Meerschweinchen.

	Behandlungsdauer nach der Zerkleinerung in Std.	Gespritzte Autolysatmenge in ccm	Kühlschrank (Kontrolle)					Brutschrank				
			Gewicht des Meerschweinchens in g	Zustand des Tieres bei Ausgang des Versuchs	Gewicht der Nebennieren in mg		Aussehen der Nebennieren	Gewicht des Meerschweinchens in g	Zustand des Tieres bei Ausgang des Versuchs	Gewicht der Nebennieren in mg		Aussehen der Nebennieren
					absolut	pro 100 g Tier				absolut	pro 100 g Tier	
I	12	25	160	munter	81	**51**	normal	155	lebt (träge)	92	**59**	Spur hyperämisch
II	12	25	155	„	87	**56**	„	155	tot in 18h	112	**72**	stark hyperämisch
III	12	25	165	„	90	**55**	„	160	„ „ 20h	112	**70**	stark hyperämisch

Tabelle 2. Wirkung von Injektion von Leberbreidialysat nach Behandlung im Kühlschrank bzw. Brutschrank (Autolyse) auf den Allgemeinzustand und die Nebennieren der Meerschweinchen.

	Behandlungsdauer nach der Zerkleinerung in Std.	Gespritzte Autolysatmenge in ccm	Kühlschrank (Kontrolle)					Brutschrank				
			Gewicht des Meerschweinchens in g	Zustand des Tieres bei Ausgang des Versuchs	Gewicht der Nebennieren in mg		Aussehen der Nebennieren	Gewicht des Meerschweinchens in g	Zustand des Tieres bei Ausgang des Versuchs	Gewicht der Nebennieren in mg		Aussehen der Nebennieren
					absolut	pro 100 g Tier				absolut	pro 100 g Tier	
I	12	25	185	munter	111	**60**	Spur hyperämisch	170	tot in 20h	102	**60**	stark hyperämisch
II	12	20	160	„	100	**62**	normal	155	„ „ 18h	152	**98**	stärkst hyperämisch
III	24	10	180	„	110	**61**	„	190	„ „ 22h	180	**95**	hyperämisch

Bei diesen Experimenten wurde methodisch gleichartig vorgegangen wie bei den Muskelautolyseversuchen. Das Ergebnis dieser Versuche war vollkommen gleichartig wie bei der Muskelautolyse. Die Leber eignete sich zu diesen Versuchen sogar besser, weil die Zerkleinerung und Verarbeitung dieses Organs leichter ist. Das Protokoll dreier Versuche ist in der Tabelle 2 festgehalten.

Gerade so wie bei den Muskelautolyseversuchen finden wir bei den Autolyseversuchen mit Leber, daß bei den Kontrolltieren keine Störungen des Allgemeinbefindens auftreten, sowie daß an deren Nebennieren keine oder nur geringe Veränderungen im Sinne gesteigerter Tätigkeit festzustellen sind, sowohl was das Gewicht als auch das histologische Bild anlangt. Die geringgradigen Veränderungen, die an den Nebennieren der Kontrolltiere zu bemerken sind, dürften wohl daher stammen, daß eine vollständige Hemmung der Autolyse bei dem angewandten Verfahren nicht möglich war. Es wäre hierzu vielleicht nötig gewesen, dauernd bei niedriger Temperatur zu arbeiten, also auch das Zerreiben und die Dialyse bei Kühlschranktemperatur durchzuführen. Im Vergleich zu den mit dem Autolysat behandelten Tieren waren an den Kontrolltieren die Allgemein- und die Nebennierenveränderungen derart geringe, daß man sie vernachlässigen kann. Während nämlich die Kontrolltiere nach 24 Stunden munter waren, gingen die Autolysattiere nach 18–22 Stunden ein. Ihre Nebennieren waren zum Teil beträchtlich vergrößert, makroskopisch dunkelrot infolge starker Hyperämie der Kapillaren und zeigten histologisch hochgradige Lipoidausschwemmung aus den Rindenzellen. Weiterhin ist aus der Tabelle ersichtlich, daß die Wirksamkeit des Autolysats von der Dauer der Autolyse abhängig ist. Nach 24 Stunden ist das Autolysat ungefähr doppelt so wirksam wie nach 12 Stunden.

Gibt man zu große Dosen dieses äußerst wirksamen Autolysats, so gehen die mit dem Autolysat gespritzten Tiere innerhalb einer halben bis einer Stunde ein. Sichere Nebennierenveränderungen sind dabei nicht nachweisbar. Es ist wohl die Zeit von der Injektion bis zum Tod des Tieres zu kurz, um an den Nebennierenrindenzellen anatomische Zeichen einer Tätigkeitssteigerung hervorzurufen. Daher war es wiederholt notwendig, zuerst die Verträglichkeit des Autolysatdialysats zu prüfen.

Fassen wir das Bisherige zusammen, so ist festzustellen, daß bei der Autolyse von Muskel und Leber ein dialysabler Stoff frei wird, der bei Übertragung auf ein Meerschweinchen Zeichen von Ermüdung bis Erschöpfung und schließlich auch den Tod bewirkt und an den Nebennierenrindenzellen Erscheinungen stärkster Steigerung der Zelltätigkeit hervorruft.

Da der Autolysestoff die Nebennieren in der beschriebenen Weise beeinflußt und an den Tieren Adynamie hervorruft, also zu Erscheinungen von Nebenniereninsuffizienz führt, war es naheliegend zu untersuchen, ob diese Veränderungen durch Rindenhormon gemildert bzw. behoben werden können.

Tabelle 3. Die Wirkung von Nebennierenrindenhormon auf d hervorgerufen

	Autolysedauer in Std.	Gespritzte Autolysatmenge in ccm	Gewicht des Meerschweinchens in g	Zustand des Tieres bei Ausgang des Versuchs	Ohne Cortin: Gewicht der Nebennieren in mg absolut	Ohne Cortin: Gewicht der Nebennieren in mg pro 100 g Tier	Aussehen der Nebennieren
I	12	19	145	tot in 14h	89	**61**	stark hyperämisch
II	12	11	145	munter	80	**55**	Spur hyperämisch
III	12	30	155	tot in 14h	121	**78**	sehr stark hyperämisch
IV	12	15	155	„ „ 20h	105	**68**	stark hyperämisch
V	14	14	160	„ „ 16h	110	**69**	sehr stark hyperämisch
VI	12	14	200	munter	120	**60**	gering hyperämisch
VII	24	10	170	tot in 12h	163	**96**	stark hyperämisch
VIII	12	20	170	„ „ 20h	121	**71**	stark hyperämisch
Durchschnittliches Nebennierengewicht pro 100 g Tier:						**70**	

Methodisch wurde folgend vorgegangen:

Das Autolysatdialysat wurde in gleicher Menge 2 Tieren intraperitoneal gespritzt. Das eine Tier erhielt außerdem eine bestimmte Menge Cortin bzw. in späteren Versuchen Corticosteron intramuskulär, das andere Tier eine entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung bzw. Olivenöl intramuskulär. Das Corticosteron wurde nur einmalig gegeben, während die Cortingaben unterteilt wurden in Einzeldosen von 3 - 5 ccm*.

Es ergab sich nun tatsächlich, wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, zum Teil eine Milderung, zum Teil eine Behebung der Wirkung des Autolysestoffs durch Rindenhormon.

Im einzelnen ist aus der Tabelle zu ersehen, daß, wie schon früher erwähnt, das Autolysat in den verschiedenen Versuchen bald stärker, bald schwächer wirksam war. Die Erklärung für diese Erscheinung wurde schon gegeben. Weiter geht aus den Versuchen auch die verschiedene Verträglichkeit bei den einzelnen Tiergrößen hervor. Wie ja zu erwarten, vertragen größere Tiere eine größere Dosis des Autolysats als kleinere Tiere. In den Versuchen, in welchen der Tod des Tieres durch Rindenhormon nicht verhindert werden konnte, ist jedesmal die Lebensdauer um einige Stunden

* Für die Überlassung des Cortins bin ich der Firma Degewop, Berlin, für die Überlassung des Corticosterons der Firma Ciba, Berlin, zu Dank verpflichtet.

Meerschweinchen von Muskel- und Leber-Autolysat-Dialysat scheinungen.

Mit Cortin						
Gespritzte Cortinmenge in ccm	Gewicht des Meerschweinchens in g	Zustand des Tieres bei Ausgang des Versuchs	Gewicht der Nebennieren in mg		Aussehen der Nebennieren	Anmerkung
			absolut	pro 100 g Tier		
6	145	tot in 16h	87	60	mäßig stark hyperämisch	Muskel
5	145	munter	65	44	normal	„
6	145	tot in 16h	88	61	mäßig stark hyperämisch	Leber
10	155	„ „ 24h	80	51	mäßig hyperämisch	„
15	160	sehr träge	80	50	wenig hyperämisch	„
12	200	munter	95	48	normal	„
Cortico-steron 20	170	sehr munter	137	80	Spur hyperämisch	„
20	190	etwas träge	130	68	wenig hyperämisch	„
				58		

verlängert worden. Wirklich gute Ergebnisse bei der Behebung der durch das Autolysat hervorgerufenen Erscheinungen konnten mit Corticosteron erzielt werden. Es mag dies vielleicht damit zusammenhängen, daß aus dem öligen Depot der Wirkstoff nur allmählich, aber dauernd abgegeben werden dürfte, während beim wässerigen Cortin nur Stöße erfolgen, weiter, daß das Corticosteron frei ist von Ballaststoffen, die bei der hohen Cortindosierung eventuell auch schädlich wirken könnten. Bei jedem Versuch war aber eine deutliche Abschwächung der Wirkung des Autolysats nach Rindenhormongabe feststellbar, sei es nun was die Allgemeinerscheinungen anlangt, sei es was die Veränderungen der Nebennieren betrifft. Zu letzterem ist noch zu sagen, daß die Nebennierengewichte der Tiere ohne Cortinbehandlung durchschnittlich um 20% höher liegen als die der mit Rindenhormon gespritzten Meerschweinchen. Ebenso war auch schon makroskopisch aus der Stärke der Hyperämie zu sagen, welche Tiere mit Rindenhormon behandelt worden und welche Tiere die Kontrollen waren. Während nämlich die Nebennieren der mit Autolysat allein behandelten Tiere dunkelrot waren, gleich denen, wie wir sie nach Diphtherietoxinvergiftung zu sehen gewohnt sind, waren die Nebennieren der mit zusätzlichen Gaben von Rindenhormon injizierten Meerschweinchen gelbrot oder gelb, also von normaler Farbe. Die histologische Untersuchung bestätigte lediglich das

aus dem makroskopischen Bild gefällte Urteil. Wenn auch nicht in allen Versuchen eine 100%ige Behebung der Erscheinungen zu erzielen war, so geht doch eindeutig hervor, daß Rindenhormon die Wirkung beheben oder mildern kann, eben je nach der Dosierung des Autolysats und der Menge des verabreichten Rindenhormons.

Besprechung der Ergebnisse.

Bei der Autolyse von Muskel und Leber wird somit ein dialysabler Stoff frei, der nach Injektion beim Tier je nach Dosierung 1. Allgemeinerscheinungen von Ermüdung bis Erschöpfung erzeugt, 2. Vergrößerung der Nebennieren mit Hyperämie der Kapillaren bewirkt, und an den Rindenzellen Zeichen von gesteigerter Zelltätigkeit herbeiführt, welche Wirkungen 3. durch Cortingabe zu mildern bzw. zu beheben sind. Es ist daher der Schluß berechtigt, daß das Cortin die Aufgabe hat, diesen bei Gewebszerfall entstehenden Stoff unwirksam zu machen. Da bei Nebennierenlosigkeit und bei Muskelarbeit ein Stoff im Blute nachweisbar wird, der die gleichen Erscheinungen am Testtier erzeugt wie durch den bei der Autolyse entstehenden Stoff und auch seine Wirkung durch Rindenhormon behoben werden kann, erscheint die Annahme wahrscheinlich, daß es sich bei übermäßiger Muskelarbeit, Muskelautolyse, Leberautolyse und bei Nebennierenlosigkeit um den gleichen Stoff handelt. Dafür spricht weiter, daß die Autolyse auch als eine bis zur Zellauflösung gesteigerte Fortsetzung der physiologischen Zelltätigkeit aufgefaßt werden kann.

Ich nehme daher an, daß der bei Nebenniereninsuffizienz auftretende Stoff auch physiologischerweise von der Zelle geliefert wird, wie etwa bei der Muskelarbeit, daß er als ein physiologisch intermediäres Stoffwechselprodukt auch normalerweise vorhanden ist, aber nicht in einer mit der bisherigen Methodik nachweisbaren Menge. Entsprechend der Größe des Stoffwechsels oder des Gewebsschadens wird bei ausreichender Regulation durch den gebildeten Stoff eine entsprechende Menge Rindenhormon zur Ausschüttung gebracht. Daß nicht nur die Muskelzelle, sondern auch andere Zellen, wie etwa die Leber, diesen Stoff produzieren können, ist eigentlich ganz natürlich, da eben nach Verzár fast zu allen Stoffwechselvorgängen Phosphorylierungen notwendig sind, die durch das Rindenhormon bewirkt werden. Um aber die Nebennieren wissen zu lassen, wieviel Hormon ausgeschüttet werden muß, wenn dieses benötigt wird, muß von den Zellen mit gesteigertem Stoffwechsel auch eine Substanz frei gemacht werden, die zur Hormonausschüttung führt. Es dürfte daher in allen Zellen diese Substanz im Stoffwechsel entstehen. Kommt es aber zu Gewebszerfall, dann eben auch zur Bildung des Stoffes in abnorm großer Menge, zu entsprechender Reaktion der Nebennierenrinde und zur Hormonausschüttung. Somit ist auch die Beteiligung der Nebennierenrinde im Sinne gesteigerter Tätigkeit bei jeder Stoffwechselsteigerung und bei jeder Gewebsschädigung verständlich, wodurch immer auch diese Gewebsschädigung hervorgerufen wird. Es ist damit

auch die Tatsache erklärbar, daß Addisonkranke besonders empfindlich sind gegen jegliche Gewebsschädigung, sei es durch Infektion, durch Gift (Narkose), durch mechanische Schäden (Operation), durch thermische Schäden, sei es durch Strahlen. Wir können es weiter auch begreifen, wieso körperlich übermäßig angestrengte Leute, wenn deren Nebennierenrinde durch die Anstrengungen schon erschöpft ist, eine Infektion oder sonst ein Gewebsschaden bedeutend schwerer überstehen, da eben zur weiteren Verarbeitung der dabei frei werdenden Stoffe das Cortin nötig ist. Ganz im Gegensatz dazu steht das richtig durchgeführte körperliche Training. Dadurch kommt es zu einer Hypertrophie der Nebennierenrinde mit vermehrter Rindenhormonproduktion und gesteigerter Abgabe desselben im Bedarfsfalle. Damit dürfte eine in gesunden Tagen durchgeführte entsprechend dosierte Körperarbeit wesentlich zu einem rascheren Überstehen einer Körperschädigung beitragen. Es sei aber hier nochmals, wie auch früher schon an anderer Stelle, darauf hingewiesen, daß nach den genannten Versuchen eine Wirkung dem Cortin nur auf die sekundären Gewebsstoffwechsel- bzw. Zerfallsprodukte zukommt, keinesfalls aber auf die primären Schädigungen, etwa auf das Gift oder die Erreger selbst. Die Bedeutung des Rindenhormons, die durch die Verzárschen Versuche klargelegt worden ist, erfährt durch die beschriebenen Experimente eine Ergänzung.

Nach dieser Auffassung wären also gewisse Stoffwechselendprodukte des physiologischen Zellstoffwechsels, Gewebsschädigungsprodukte, die bei Vergiftungen, Infekten und physikalischen Schäden entstehen, und der bei Nebenniereninsuffizienz auftretende Stoff einander gleich oder zumindest chemisch höchst nahestehend. Der bei Nebenniereninsuffizienz entstehende Stoff wäre nach dieser Auffassung bei Überproduktion ein Schadensstoff aus der Gruppe intermediärer körpereigener Krankheitsstoffe, die vielen äußeren Schädigungen und inneren Störungen gemeinsam sein können nach der Art, wie das für das Histamin als gemeinsamen Zwischenträger vieler Entzündungen angenommen wird. Ich möchte aber nicht annehmen, daß er mit dem Histamin identisch ist. Zur Begründung dieser meiner Auffassung möchte ich eine Beobachtung von Banting und Gairns anführen. Wurde einem Hund eine Nebenniere entfernt und das Mark der anderen Nebenniere zerstört, lebten die Hunde monatelang weiter. Wurden sie auf hohe Eiweißkost gesetzt, gingen sie innerhalb weniger Tage ein. Das übriggebliebene Nebennierenrindengewebe war demnach nicht imstande, die Wirkung der in großer Menge resorbierten Eiweißspaltprodukte zu paralysieren. Vielleicht könnte man auch sagen, daß unter den Eiweißspaltprodukten zuviel von dem Stoff vorhanden gewesen sei, der bei Nebenniereninsuffizienz nachweisbar ist, und daß dadurch der Tod der Hunde herbeigeführt wurde. Daß Histamin dabei die ursächliche Substanz sei, ist unwahrscheinlich, weil Histamin bei dieser Art der Zufuhr auch in großen Dosen vertragen wird.

Hasch und Hajdu glauben auf Grund ihrer Versuche annehmen zu dürfen, daß die nach Muskelarbeit hervorgerufene Nebennierenhypertrophie durch Cholesterin bewirkt wird. Nun ist es ja, wie auch die Autoren selbst angeben, schon lange bekannt, daß man durch Cholesterin eine Nebennierenvergrößerung erzeugen kann. Während aber durch den bei Nebenniereninsuffizienz festgestellten Stoff eine Lipoidverarmung der Nebennierenrinde, also wahrscheinlich eine Hormonausschüttung bewirkt wird, ist nach Gabe von Cholesterin und ähnlich gebauten Körpern, z. B. Digitalis, eine Anreicherung von Lipoid, also wohl eine Hormonspeicherung feststellbar (Westphal). Aus diesem Grunde halte ich auch das Cholesterin nicht für den Stoff, welcher auf humoralem Wege die Nebennierenhypertrophie nach Muskelarbeit bewirkt.

Der von mir gefundene Stoff, sei es als Stoffwechselprodukt, sei es als Gewebsschädigungsprodukt, sei es als Produkt der Nebenniereninsuffizienz, wäre somit sozusagen in einer Person Träger der Schadenswirkung (Muskelermüdung, Tod), wie auch Anreiz zu seiner eigenen intermediären Entgiftung durch eine entsprechend vermehrte Rindenhormonausschüttung.

Zum Schluß möchte ich noch zurückkommen auf die eingangs gemachte Annahme, daß die Störung des Elektrolyt-Wasserhaushalts als sekundär abhängig von der mangelnden Phosphorylierung und von dem vermehrten Auftreten von Zellspaltprodukten und unter diesen des bei Nebenniereninsuffizienz nachweisbaren Stoffs aufgefaßt werden kann. Die Vorgänge dabei möchte ich in folgender Hypothese, die sich auf die geschilderten Versuche stützt, erklären:

Nimmt man an, daß beim Zellstoffwechsel und bei Gewebsschäden aus höher gebauten molekularen Verbindungen niedriger gebaute Verbindungen entstehen, die noch nicht diffusibel sind und die Zelle, in der sie gebildet werden, noch nicht verlassen können, daß sie aber entsprechend ihrer zahlreichen Molekülzahl eine höhere osmotische Wirkung entfalten als ihre nativen Ausgangsstoffe, so entsteht in der Zelle eine osmotische Hypertonie gegenüber der umgebenden Flüssigkeit. Bei Vorhandensein von Cortin, bei leistungsfähiger Nebennierenrinde oder bei künstlicher Zufuhr von Cortin sind in allen erwähnten Versuchen die schädlichen Wirkungen ausgeblieben. Daher darf weiter angenommen werden, daß der Phosphorylierungskatalysator Cortin die Wirkung der angenommenen Abbauprodukte zu beheben und diese in eine unwirksame Form umzuwandeln vermag. Ob diese Umwandlung durch Resynthese oder weiteren Abbau bis zu diffusiblen Spaltprodukten geschieht, kann noch nicht gesagt werden, es ist nur höchst wahrscheinlich, daß Phosphorylierungen dabei maßgeblich sind. Als Folge der durch die erwähnten Spaltprodukte herbeigeführten intrazellulären osmotischen Hypertonie wird Wasser aus dem Blute angezogen. Dies zeigen Versuche von Zwemer und Truszkowski, welche eine Quellung des Muskels bei nebennierenlosen Tieren fanden. Die Zelle

quillt also. Das Blut und die Blutflüssigkeit werden dadurch eingedickt, und es entsteht nun auch im Blute eine osmotische Hypertonie. Damit muß aber im Interesse der anderen gerade ruhenden Körperzellen wieder die osmotische Isotonie des Blutes hergestellt werden. Dies geschieht nun bei Rindenhormonmangel durch vermehrte Chlor- und Natriumausscheidung durch die Niere (Harrop, Nicholson und Strauss). Das Blut wird also nochmals eingedickt, ist aber nunmehr wieder isotonisch. Daß diese Annahme zu Recht besteht, dafür sprechen Versuche von Swingle und Mitarbeitern. Nach den genannten Autoren ist die Anhydrämie bei Nebennierenmangel bedingt durch Wasserabstrom in die Zellen und durch die Niere. Das Kalium der Zellen bleibt in diesen (Zwemer und Truszkowski), ich meine wohl deshalb, weil es infolge fehlender Phosphorylierung an impermeable Spaltprodukte gebunden ist. Das Kalium dürfte somit osmotisch aktiv, aber nicht diffusibel sein. Zur Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts kann Kalium aus dem Blute nicht abwandern, wodurch der Kaliumspiegel im Blute steigt.

Somit läßt sich die Hyponaträmie, die Hypochlorämie und die Hyperkaliämie, sowie die Bluteindickung als Folgeerscheinung erklären.

Zusammenfassung.

1. Bei der Autolyse von Muskel und Leber wird ein dialysabler Stoff frei, welcher nach Injektion beim Meerschweinchen zu Ermüdung bis Erschöpfung und zu Nebennierenveränderung im Sinne einer gesteigerten Rindentätigkeit führt.

2. Die Wirkung dieses Stoffes auf das Meerschweinchen ist durch Gabe von Rindenhormon zu mildern bzw. zu beheben.

3. Es wird die Identität dieses Stoffes mit der bei nebennierenlosen Kaninchen und Addisonkranken im Blute auftretenden Substanz erörtert.

4. Die mögliche Ursache der Elektrolyt-Wasserhaushaltstörung als Folge des Auftretens von nicht abgebauten intermediären Stoffwechselprodukten wird besprochen.

5. Auf die Bedeutung der Bildung dieses Stoffes durch das Gewebe für den normalen Stoffwechsel und für viele Krankheitsprozesse die mit einer Gewebsschädigung einhergehen, wird kurz hingewiesen.

Literatur.

Banting u. Gairns: Amer. J. Physiol. **77**, 100 (1926). – Harrop, Nicholson u. Strauss: J. exper. Med. (Am.) **64**, 233 (1936). — Hasch u. Hajdu: Pflügers Arch. **241**, 507 (1939). — Langlois: Les capsules surrenales. Paris: Felix Alcan 1897. — Laves: Klin. Wschr. **1939**, I, S. 724. — Loeb u. Mitarbeiter: J. amer. med. Assoc. **104**, 2149 (1935). — Molnar u. Petranyi: Klin. Wschr. **1939**, II, S. 1191. — Riml: Pflügers Arch. **238**, 345 (1936); Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 35 (1937); **189**, 659 (1938); Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1938**, S. 225; Z. Klin. Med. **134**, 1 (1938); Klin. Wschr. **1939**, I, S. 265. — Swingle, Pfiffner, Vars u. Parkins: Amer. J. Physiol. **108**, 428 (1934). — Verzár: XVI. internat. Physiol. Kongr. Zürich 1938. Kongreßbericht I, S. 50. Daselbst weitere Literatur. – Westphal: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1938**, S. 242. — Zwemer u. Truszkowski: Endocrinology **21**, 40 (1937).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.
(Direktor: Prof. Dr. E. Keeser.)

Vergleichende Untersuchungen über die Wirkungsstärke des Morphins und seiner Derivate.

I. Mitteilung.

Von

H.-A. Oelkers.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Dezember 1939.)

In der einschlägigen Literatur über die Behandlung Kampfstoffvergifteter wird angegeben, daß zur Behebung der starken Unruhe und des quälenden Hustenreizes bei Grünkreuzvergiftung Eukodal verabfolgt werden dürfe, während Morphin wegen der Gefahr der Atemlähmung als streng kontraindiziert bezeichnet wird (vgl. z. B. Muntsch[1], Laun[2]).

Diese Angabe läßt darauf schließen, daß von den betreffenden Autoren angenommen wird, daß Eukodal im Gegensatz zu Morphin in therapeutisch geeigneten Dosen keine oder doch nur eine sehr geringe lähmende Wirkung auf das Atemzentrum ausübt. Da nun in der pharmakologischen Literatur keine Anhaltspunkte für eine solche Annahme aufzufinden waren, so wurden einige Versuche zur Aufklärung dieser Frage vorgenommen. Außer Morphin und Eukodal (Dihydrooxykodeinonhydrochlorid) wurden noch Dilaudid (salzsaures Dihydromorphinon), Dicodid- (Dihydrokodeinon) hydrochlorid und Codein in die Untersuchungen einbezogen.

Die Versuche wurden zunächst in ähnlicher Weise wie von R. Gottlieb[3] an gesunden, 2,5—3 kg schweren, nüchternen Kaninchen durchgeführt. Hierbei ergab sich in recht guter Übereinstimmung mit diesem Autor, daß die kleinste Dosis, die bei subcutaner Injektion eine deutliche Herabsetzung der Atemfrequenz (um 20 bis 25 %) hervorruft, für Morphinhydrochlorid etwa 0,8—1,0 mg, für Dicodid etwa 0,5—0,6 mg und für Dilaudid etwa 0,2—0,3 mg pro kg Körpergewicht beträgt.

Die Prüfung des Eukodals zeigte, daß diese Verbindung stärker atemlähmend wirkt als die von Gottlieb untersuchten Alkaloide: Als kleinste Dosis, die die Atemfrequenz bei den Kaninchen deutlich herabzusetzen vermochte, wurde 0,2 mg (bei einigen Tieren sogar 0,1 mg) pro kg Körpergewicht gefunden. Viel schwächer atemlähmend wirkte Codeinphosphat.

[1] Muntsch, O.: Leitfaden der Pathologie u. Therapie der Kampfgaserkrankungen, S. 56 u. 317. Leipzig, Georg Thieme Verlag, 1939. — [2] Laun, R.: Vademecum f. d. Truppenarzt, S. 61. München-Berlin, Lehmanns Verlag, 1939. — [3] Gottlieb, R.: Münch. med. Wschr. **1926**, S. 595.

Von diesem Salz mußten 4—5 mg pro kg Körpergewicht subcutan injiziert werden, um eine Verminderung der Zahl der Atemzüge herbeizuführen. Bei allen Verbindungen begann die Verminderung der Atemfrequenz etwa 7—10 Minuten nach der subcutanen Injektion und erreichte 15—20 Minuten nach der Injektion das Maximum. Die Wirkung hielt gewöhnlich mehrere Stunden an, doch zeigten die einzelnen Tiere sich hierbei etwas verschieden.

Die geschilderten Versuche befriedigten jedoch nicht völlig, da es sich herausstellte, daß Kaninchen bei längerer Beobachtung auch ohne Behandlung eine recht wechselnde Atemtätigkeit zeigen. So kommt es verhältnismäßig häufig vor, daß ein Kaninchen, das bereits längere Zeit hindurch völlig ruhig und gleichmäßig geatmet hat (z. B. 60—80 Atemzüge pro Minute), plötzlich und ohne ersichtlichen Grund für längere Zeit eine flache und sehr rasche Atmung aufweist (120—160 Atemzüge pro Minute). Seltener wurde beobachtet, daß die Atemtätigkeit spontan für längere Zeit auffällig verlangsamt wurde (auf weniger als 60 Atemzüge pro Minute). Trotzdem erschien es möglich, daß die Beurteilung der atmungslähmenden Wirkung der genannten Alkaloide auf die geschilderte einfache Weise zu größeren Fehlern führen könnte. Es wurden daher weitere Versuche an Kaninchen in Urethannarkose vorgenommen. Blutdruck (A. carotis, Quecksilbermanometer) und Atmung (Tracheotomie, Mareysche Kapsel) wurden hierbei fortlaufend registriert. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, welche kleinste Dosis der verschiedenen Alkaloide bei intravenöser Injektion (Jugularvene) gerade zum Tode durch vollständige Lähmung des Atemzentrums ausreicht. Hierbei zeigte es sich zunächst, daß die Konzentration der zu untersuchenden Alkaloidlösungen für den Ausfall der Versuche wichtig ist. Werden stark verdünnte Lösungen (in physiologischer Kochsalzlösung) der Alkaloide benutzt, so sind die Dosen, die zum Stillstand der Atmung führen, höher als bei Verwendung konzentrierter Lösungen. Auch die Injektionsgeschwindigkeit spielt eine Rolle. Durch die in kurzen Zwischenräumen wiederholten Injektionen einer schwach konzentrierten Lösung läßt sich mitunter überhaupt kein Atemstillstand erzielen. Es kommt hierbei häufig nur dazu, daß die Atemfrequenz nach den ersten Injektionen stark abnimmt, um dann nach einigen weiteren Injektionen schließlich wieder zuzunehmen. Am deutlichsten zeigte sich dieses Verhalten bei Codein, am wenigsten war es bei den Versuchen mit Eukodal vorhanden.

Die Abb. 1 gibt einen derartigen Versuch wieder, bei dem einem 3,6 kg schweren Kaninchen in Abständen von 3—5 Minuten je 1 ccm einer 2%igen Lösung von Codeinphosphat pro kg Körpergewicht intravenös injiziert wurden (Zeitmarkierung: 20 Sekunden).

Die Atemfrequenz sank nach der ersten Injektion ziemlich stark (von 96 auf 36 Atemzüge pro Minute), während die zweite und dritte Injektion keinen bedeutenden Einfluß auf die Atemtätigkeit mehr hatten. Nach der vierten Injektion erfolgten kleine, frequente, zunächst von

längeren Pausen unterbrochene Atembewegungen. Nach der fünften Injektion stieg dann plötzlich die Atemtätigkeit stark (auf 100, nach einigen Minuten auf 134, später auf 168 Atemzüge pro Minute) an. Das Tier hatte nach dieser Injektion dreimal in Abständen von 2 Minuten kurzdauernde Krampfanfälle.

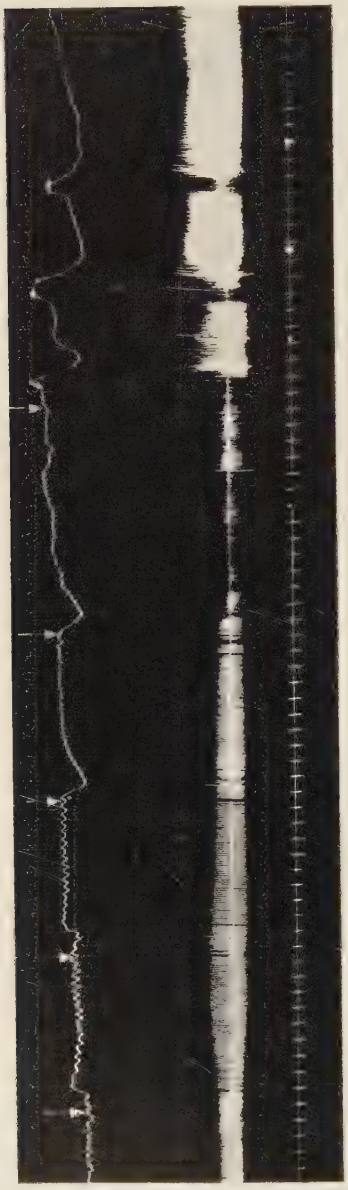


Abb. 1.

Ein ganz anderes Bild ergibt sich bei Injektion konzentrierter Lösungen. So zeigt Abb. 2 die Wirkung der intravenösen Injektion von 2 ccm einer 6%igen Codeinphosphatlösung bei einem 2 kg schweren Kaninchen. Es kommt hiernach sehr rasch zu vollständiger Lähmung der Atmung.

Da — wie erwähnt — auch die anderen untersuchten Alkaloide (bis auf Eukodal) sich ähnlich verhalten, wurde daher schließlich so verfahren, daß von jedem der genannten Alkaloide festgestellt wurde, welche Konzentration die Lösung haben mußte, damit die intravenöse Injektion von 1 ccm dieser Lösung pro kg Körpergewicht gerade Atemstillstand herbeiführte. Um individuelle Verschiedenheiten der Versuchstiere auszuschließen, wurden die Werte an mindestens drei Versuchstieren nachkontrolliert.

Hierbei ergab es sich, daß vom Morphinhydrochlorid 1,0—1,2%ige Lösungen, vom Dicodid 0,7—0,8%ige Lösungen, vom Dilaudid 0,25 bis 0,3%ige Lösungen und vom Eukodal 0,15—0,2%ige Lösungen in der Dosis von 1,0 ccm pro kg Körpergewicht intravenös injiziert den Tod der Tiere durch Atemstillstand herbeiführten. Die atemlähmende Wirkung des Codeinphosphats erwies sich als wesentlich geringer. Erst die intravenöse Injektion von 1 ccm einer 6%igen Lösung pro kg Körpergewicht bewirkte bei diesen Versuchen regelmäßig ein rasches Aufhören der Atemtätigkeit.

Hierbei mag erwähnt werden, daß der durch die genannten Alkaloide hervorgerufene Atemstillstand sich gewöhnlich durch eine intravenöse Cardiazolgabe (0,05—0,1 ccm einer 10%igen Lösung pro kg Körpergewicht intravenös) rasch beheben ließ (vgl. hierzu Behrens und Reichelt[4]). Voraussetzung für die günstige Wirkung war jedoch, daß die Injektion bald nach dem Aufhören der Atemtätigkeit erfolgte. Wurde Cardiazol erst mehrere Minuten später, zu einer Zeit, wo auch der Blutdruck im raschen Fallen begriffen war, verabfolgt, so war das Leben des Tieres häufig nicht mehr zu retten.

Die Dosen, die, pro kg Körpergewicht intravenös injiziert, gerade mit Sicherheit Atemstillstand bei Kaninchen in Urethannarkose hervorrufen, betragen also unter den angegebenen Versuchsbedingungen vom

Morphinhydrochlorid	10	—12 mg
Dicodidhydrochlorid	7	— 8 „
Dilaudid	2,5	3 „
Eukodal	1,5	— 2 „
Codeinphosphat rund		60 „

pro kg Körpergewicht.

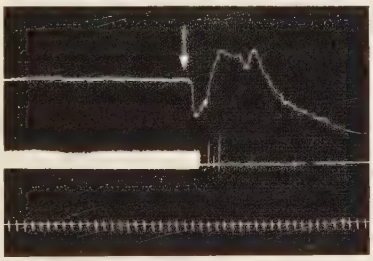


Abb. 2.

Einige Versuche an nicht narkotisierten Kaninchen zeigten, daß es hier in der Regel nicht gelingt, durch die intravenöse Injektion der genannten und etwas höherer Dosen der verschiedenen Alkaloide Atemstillstand zu erzielen. Die Atembewegungen werden zwar stark herabgesetzt, hören in einigen Fällen für kurze Zeit (etwa $^1/_2$—$1^1/_2$ Minuten) ganz auf, kehren aber dann fast immer spontan zurück. Die Tiere blieben dann für mehrere Stunden in einem narkoseartigen Zustand, in dem aber Seitenlage meist nicht vertragen wurde, und erholten sich später rasch.

Einige Versuche an Katzen in Urethannarkose hatten hinsichtlich der atemlähmenden Wirkung der einzelnen Alkaloide im ganzen ein ähnliches Ergebnis wie die entsprechenden Versuche an Kaninchen. Indessen waren die Dosen, die bei intravenöser Injektion Atemlähmung hervorbrachten, bei diesen Tieren etwas höher. Ferner hielt der Atemstillstand nach den geeigneten Dosen der Alkaloide oft nur 1—2 Minuten an und die Atmung kehrte dann spontan zurück, blieb allerdings stark verlangsamt. Injizierte man höhere Dosen, so dauerte auch dann der Atemstillstand oft nur kurze Zeit. Die kleinsten Gaben, die bei Injektion in die Jugularvene ein Aufhören der Atembewegungen für 1—2 Minuten (oder gelegentlich auch gänzlichen Atemstillstand) verursachten, betrugen bei intravenöser Injektion (Jugularvene) und pro kg Körpergewicht für Morphinhydro

[4] Behrens, B. u. R. Reichelt: Klin. Wschr. **1933**, S. 1860.

chlorid 13—15 mg, für Dicodid 9—10 mg, für Dilaudid 3—4 mg und für Eukodal 2,5—3 mg. Versuche mit Codein wurden nicht vorgenommen.

Deutlicher noch als bei den Versuchen an Kaninchen fiel auf, daß die mehrfache Injektion schwächerer Lösungen der Alkaloide erheblich weniger stark atemlähmend wirkt, als die entsprechende Alkaloidmenge auf einmal in konzentrierter Lösung injiziert. Es kam hierbei nach einem Stadium stark verlangsamter Atmung nach weiteren Injektionen wieder zu einer Zunahme der Atemtätigkeit, die allerdings meist nicht den Umfang erreichte wie bei den entsprechenden Versuchen an Kaninchen.

Ferner fiel auf, daß Morphin und die anderen Alkaloide bei Katzen bereits in verhältnismäßig kleinen Dosen blutdrucksenkend wirken, während bei Kaninchen Gaben, die die Atemfrequenz stark herabsetzen, gewöhnlich eine — oft beträchtliche — Erhöhung des Blutdrucks hervorrufen. Eigenartigerweise scheint aber nach Injektion sehr hoher Morphindosen (durch wiederholte Verabfolgung kleiner Dosen) der Tod bei Kaninchen in der Hauptsache durch eine Kreislaufschädigung (Herzschädigung?) einzutreten, während bei Katzen die Atemlähmung dem Herzstillstand vorangeht. Krämpfe wurden bei den Versuchen mit Morphin weder bei Kaninchen noch bei Katzen beobachtet. Die anderen Alkaloide, insbesondere Codein und Dicodid, führten dagegen nach hohen Dosen in der Regel zu wiederholten Krampfanfällen.

Bei Versuchen an der decapitierten Katze (Registrierung von Blutdruck und Herzvolumen) führte Morphin in Dosen von 5—20 mg pro kg (1 %ige Lösung) keine deutliche Blutdrucksenkung herbei. Die wiederholte Injektion größerer Dosen (je 20—40 mg pro kg in Form 2—4 %iger Lösungen) verursachte neben einer Senkung des Blutdrucks anfänglich Extrasystolie, später Herzblock, der sich zunächst immer wieder zurückbildete, bis schließlich nach einer größeren Zahl von Injektionen Herzstillstand in Diastole erfolgte. Die Wirkung scheint jedoch nicht von der insgesamt verabfolgten Morphinmenge, sondern hauptsächlich von der Konzentration der verabfolgten Morphinlösung abzuhängen. Gelegentlich verursachte bereits die erste oder zweite Injektion einer 4 %igen Morphinlösung diastolischen Herzstillstand.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurden die fünf Alkaloide durch Bestimmung der letalen Dosen bei subcutaner Injektion an weißen Mäusen miteinander verglichen.

Da das Ergebnis dieser Toxizitätsprüfungen von den in der Literatur (vgl. z. B. die zusammenfassende Darstellung von Starkenstein[5]) angegebenen Befunden nicht unerheblich abweicht, so sei erwähnt, daß für die Versuche 15—18 g schwere Mäuse — nur selten schwerere Tiere — zur Verwendung kamen. Erheblich leichtere Tiere (unter 12 g) zeigten

[5] Starkenstein, E.: Handb. exper. Pharmakol. II, **2**, 917 (1924).

eine etwas größere Empfindlichkeit als die benutzten Tiere, während schwerere (20—22 g) sich praktisch nicht von den etwas leichteren unterschieden.

Wichtig ist ferner die Konzentration der verwendeten Lösungen, da konzentrierte Lösungen etwas giftiger sind als stärker verdünnte. Bei den Toxizitätsbestimmungen wurden vom Morphin 0,5%ige und von den anderen Alkaloiden 0,3—0,5%ige Lösungen benutzt. Als Lösungsmittel diente 0,45%ige sterile Kochsalzlösung.

Die Lösungen wurden mittels einer in 0,01 ccm unterteilten Spritze subcutan injiziert. Hierbei ist die Verwendung einer Spezialkanüle (z. B. Nr. 21, 30 mm) wichtig. Der Einstich muß dicht oberhalb der Schwanzwurzel erfolgen; die Kanülenspitze wird bis fast zur Nackengegend vorgeschoben. Auf diese Weise ist die Injektion größerer Flüssigkeitsvolumina möglich, ohne daß die Gefahr des teilweisen Herauslaufens der Lösung aus dem Stichkanal besteht.

Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, daß die Empfindlichkeit weißer Mäuse gegen Morphin und vielleicht auch gegen die anderen Alkaloide bis zu einem gewissen Grade von der Jahreszeit und vielleicht auch von der Fütterung abhängig ist.

So wurde bei Toxizitätsbestimmungen, die in den Monaten Juni und Juli an rund 100 Mäusen vorgenommen worden waren, als sicher tödliche Dosis für Morphinhydrochlorid 0.40 mg pro g Maus gefunden. Bei subcutaner Injektion von 0,30 mg pro g starben 50% der Versuchstiere; 0,25 mg pro g wirkten bei 10% der Versuchstiere tödlich.

Bei der Wiederholung dieser Bestimmungen in den Monaten September Oktober und November fanden sich trotz gleicher Versuchstechnik und trotz Verwendung von Mäusen gleicher Herkunft höhere Werte, wie aus der Tabelle 1 hervorgeht.

Tabelle 1.

Morphinhydrochlorid mg pro g Maus	Zahl der Versuchstiere	Gestorbene Tiere		Morphinhydrochlorid mg pro g Maus	Zahl der Versuchstiere	Gestorbene Tiere	
		Anzahl	%			Anzahl	%
0,22	10	0	0	0,38	10	3	30
0,24	10	1	10	0,40	12	3	25
0,25	8	0	0	0,42	8	3	38
0,27	6	1	17	0,44	9	4	44
0,28	8	1	13	0,45	17	10	59
0,30	16	7	44	0,48	10	7	70
0,32	12	4	33	0,50	10	9	90
0,35	18	4	22	0,52	8	8	100

Die Tabelle zeigt, daß als sicher tödliche Dosis von Morphinhydrochlorid unter den angegebenen Versuchsbedingungen erst 0,5—0,52 mg pro g Maus anzusehen sind. Die gefährlichen Dosen beginnen indessen bereits bei 0,24—0,27 mg pro g Maus und nach Injektion von 0,30 mg

Morphinhydrochlorid pro g Maus ist die Zahl der tödlich vergifteten Tiere bereits recht erheblich. Werden daher – wie das häufig geschieht — nur wenige Tiere (3—4 pro Dosis) zu derartigen Toxizitätsbestimmungen herangezogen, so erhält man mit hoher Wahrscheinlichkeit eine zu niedrige „sicher letale" Dosis.

An Vergiftungssymptomen zeigten die Mäuse eine etwa 5—10 Minuten nach der Injektion beginnende, zunehmende Lebhaftigkeit, die sich in ruhelosem Umherkriechen äußerte. Bald danach traten die bekannte Schwanzreaktion und Spasmen der hinteren Extremitäten ein. Im späteren Verlauf wechselten Zustände von mehr oder minder deutlicher Narkose, die mitunter von leichten Krämpfen unterbrochen wurde, mit neuem ruhelosen Umherkriechen, das durch Krampfanfälle und teilweise Lähmung gestört wurde, miteinander ab. Der Tod erfolgte bei einigen Tieren während oder kurz nach einem Krampfanfall oder in einem Stadium allgemeiner Lähmung (frühestens $1^1/_2$—2 Stunden, mitunter erst 24–30 Stunden nach der Morphininjektion).

Dicodidhydrochlorid erwies sich als wesentlich giftiger als Morphin. Die Tabelle 2 zeigt, daß 0,22 mg pro g Maus in Form einer 0,3%igen Lösung subcutan injiziert als sicher letal anzusehen sind. Die gefährlichen Dosen beginnen bei 0,14—0,15 mg pro g Maus.

Tabelle 2.

Dicodid-hydrochlorid mg pro g Maus	Zahl der Versuchs-tiere	Gestorbene Tiere		Dicodid-hydrochlorid mg pro g Maus	Zahl der Versuchs-tiere	Gestorbene Tiere	
		Anzahl	%			Anzahl	%
0,10	8	0	0	0,16	12	8	60
0,11	6	0	0	0,18	10	7	70
0,12	6	0	0	0,20	12	10	83
0,14	8	1	13	0,22	10	10	100
0,15	10	5	50				

Als sicher tödliche Dosis von Dilaudid sind bei subcutaner Injektion in Form einer 0,3- und 0,5%igen Lösung 0,15—0,17 mg pro g Maus anzusehen. Die Tabelle 3 zeigt weiter, daß die gefährlichen Dosen bei 0,07 bis 0,08 mg pro g Körpergewicht beginnen.

Tabelle 3.

Dilaudid mg pro g Maus	Zahl der Versuchs-tiere	Gestorbene Tiere		Dilaudid mg pro g Maus	Zahl der Versuchs-tiere	Gestorbene Tiere	
		Anzahl	%			Anzahl	%
0,06	10	0	0	0,12	12	10	83
0,07	10	1	10	0,13	10	7	70
0,08	10	2	20	0,15	10	9	90
0,09	12	7	58	0,17	10	10	100
0,10	10	7	70				

Eukodal ist bei subcutaner Injektion für Mäuse nur wenig giftiger als Morphinhydrochlorid. Die Tabelle 4 zeigt, daß die gefährlichen Dosen bei 0,22—0,25 mg pro g Maus beginnen. Als sicher tödlich sind 0,45 bis 0,48 mg pro g Maus anzusehen.

Tabelle 4.

Eukodal mg pro g Maus	Zahl der Versuchstiere	Gestorbene Tiere		Eukodal mg pro g Maus	Zahl der Versuchstiere	Gestorbene Tiere	
		Anzahl	%			Anzahl	%
0,20	8	0	0	0,35	12	4	33
0,22	8	1	13	0,37	8	4	50
0,25	12	3	25	0,40	12	5	42
0,27	6	1	17	0,42	8	5	63
0,30	12	7	58	0,45	11	10	91
0,32	8	3	38	0,48	9	9	100

Aus der folgenden Tabelle 5 geht hervor, daß Codeinphosphat bei subcutaner Injektion erheblich giftiger ist als Morphinhydrochlorid. Die gefährlichen Dosen beginnen bereits bei 0.20 mg pro g Maus. Nach Injektion von 0.25 mg pro g sterben etwa 50% der Versuchstiere. Als sicher tödlich ist die Verabfolgung von 0.35 mg pro g Maus anzusehen. Das Vergiftungsbild weicht kaum von dem der Vergiftung mit Morphin oder einem der anderen Alkaloide ab. Die Krämpfe pflegen allerdings etwas stärker zu sein und der Tod tritt etwas rascher ein als nach der Verabfolgung tödlicher Dosen der anderen Alkaloide.

Tabelle 5.

Codeinphosphat mg pro g Maus	Zahl der Versuchstiere	Gestorbene Tiere		Codeinphosphat mg pro g Maus	Zahl der Versuchstiere	Gestorbene Tiere	
		Anzahl	%			Anzahl	%
0,15	6	0	0	0,30	22	13	59
0,18	6	0	0	0,32	9	7	78
0,20	8	1	13	0,34	7	5	72
0,22	6	2	33	0,35	10	10	100
0,25	9	5	61	0,38	6	6	100
0,28	9	2	22				

Das Ergebnis der Toxizitätsprüfungen weicht von den Befunden, die bei der Prüfung auf atemlähmende Wirkung erhalten wurden, zum Teil erheblich ab. Eukodal, das von den untersuchten Alkaloiden das Atemzentrum am stärksten lähmen dürfte, erweist sich trotzdem bei der subcutanen Injektion kaum giftiger als Morphin, während Codein, dessen atemlähmende Wirkung gering ist, für Mäuse und nach einigen vorliegenden Literaturangaben (vgl. z. B. bei Starkenstein, l. c.), sowie nach eigenen Erfahrungen auch für andere Tiere (Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen) erheblich giftiger ist als Morphin. Die Ursachen hierfür sind vorerst nicht mit Sicherheit bekannt. Sie beruhen aber fraglos nur zum Teil darauf, daß die geprüften Alkaloide in hohen Dosen verschieden stark wirkende Krampfgifte sind, denn mindestens ein Teil der Tiere stirbt nach eigenen Beobachtungen infolge Aufhörens der Atembewegungen, wobei das Herz noch kurze Zeit weiterschlägt.

Kurz (mitunter mehrere Stunden) vor dem Tode sind die Tiere außerordentlich hinfällig und sind anscheinend teilweise (besonders an den hinteren Extremitäten) gelähmt. Sie liegen meist flach und sehr langsam

atmend ruhig in einer Ecke. Mitunter treten aber auch jetzt noch Zustände von Unruhe auf, so daß die Tiere umherzukriechen versuchen. Legt man sie auf den Rücken, so bleiben sie nur kurze Zeit ruhig liegen und versuchen dann — oft vergeblich — sich wieder aufzurichten. Von Zeit zu Zeit pflegt ein kurzdauernder, leichter Tetanusanfall, der besonders die hinteren Extremitäten betrifft, aufzutreten. Nach einem dieser Anfälle hört dann mitunter nach einigen in längeren Pausen erfolgenden schnappenden Atemzügen die Atemtätigkeit auf. In anderen Fällen sterben die Tiere, die fast ganz gelähmt zu sein scheinen, ohne Krämpfe, indem die Atmung, die längere Zeit hindurch kaum feststellbar gering sein kann, schließlich ganz aufhört. Möglicherweise sterben die Tiere nach hohen Dosen der genannten Alkaloide, zum Teil durch eine Lähmung der Atemmuskulatur.

Nach dem oben Gesagten wird man das Ergebnis vergleichender Toxizitätsprüfungen nicht zur Beurteilung toxischer Nebenwirkungen der Morphinderivate beim Menschen heranziehen können. Dagegen ist dies sicherlich bis zu einem gewissen Grade mit dem Ergebnis der Prüfung auf atmungslähmende Wirkung der Fall. Um nun einen Eindruck von der therapeutischen Wirksamkeit der verschiedenen Alkaloide zu erhalten, wurden in weiteren Versuchsreihen vergleichende Untersuchungen über die analgetische Wirkungsstärke vorgenommen. Zur Prüfung der analgetischen Wirksamkeit der fünf Alkaloide wurde das Verfahren von Hesse[6] an weißen Mäusen benutzt. Die Schmerzempfindlichkeit der Tiere wird hierbei dadurch geprüft, daß mit den Branchen einer Arterienklemme Analschleimhaut und Schwanzwurzel gleichzeitig gefaßt werden. Aus der Stärke oder dem Fehlen der Abwehrreaktion kann auf das Vorhandensein einer mehr oder minder vollständigen Analgesie geschlossen werden. Infolge seiner Einfachheit ermöglicht das Verfahren Versuche an einer großen Tierzahl. Es lassen sich daher Fehler durch individuelle Verschiedenheiten der Tiere weitgehend vermeiden. Die Mittel wurden den Tieren bei diesen Versuchen nicht wie bei Hesse peroral mittels Schlundsonde, sondern in physiologischer Kochsalzlösung gelöst subcutan verabfolgt. Hierbei wurde darauf geachtet, daß die zu prüfende Dosis sich in 0.2—0.6 ccm Flüssigkeit befand. Jede Dosis wurde mehrmals (drei- bis viermal) an Gruppen zu je vier bis sechs noch nicht zu Versuchen gebrauchten Mäusen ausgetestet. Dies war notwendig, weil sich mitunter recht erhebliche Verschiedenheiten bei den einzelnen Tieren zeigten.

Die folgende Tabelle 6 gibt das Ergebnis dieser Versuche an insgesamt 400 bis 500 Mäusen wieder. Für jedes Alkaloidsalz werden zunächst die kleinsten Dosen, die eine merkliche Abschwächung der Schmerzreaktion bei 30—50% der Versuchstiere herbeiführten, aufgeführt. Ferner werden die kleinsten Dosen angegeben, die bei einigen Tieren (10—20%) bereits volle Analgesie hervorriefen, während die anderen Tiere nur eine deutliche Abschwächung der Schmerzreaktion aufwiesen. Schließlich finden sich

[6] Hesse, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **158**, 233 (1930).

Tabelle 6.

	Abschwächung der Schmerzreaktion bei 30—50% der Versuchstiere mg pro g Maus	Volle Analgesie bei 10—20% der Versuchstiere mg pro g Maus	Volle Analgesie bei 80—100% der Versuchstiere mg pro g Maus
Morphinhydrochlorid....	0,006—0,008	0,03 —0,04	0,08
Dicodidhydrochlorid	0,008—0,01	0,02 —0,03	0,1
Dilaudid.....	0,001—0,002	0,003—0,004	0,006
Eukodal.....	0,002—0,003	0,005—0,006	0,01
Codeinphosphat	0,06 —0,08	0,08 —0,1	—

in der Tabelle die Dosen, die 80 -100% der Versuchstiere unempfindlich gegen den gesetzten Reiz machten.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die subcutane Injektion von 0,08 mg Morphinhydrochlorid pro g Maus volle Analgesie hervorzurufen pflegt. Dieser Befund stimmt recht gut mit dem Ergebnis der Versuche von Hesse überein, der diese Wirkung bei peroraler Zufuhr mit 0,1 mg pro g Maus erhielt. Bereits die halbe Dosis hatte dann aber bei seinen Versuchen eigenartigerweise nur bei einem von sechs Tieren eine Herabsetzung der Schmerzempfindung zur Folge und eine noch kleinere Gabe erwies sich als wirkungslos, während bei den hier beschriebenen Versuchen noch die Injektion von 0,03 –0,04 mg pro g Maus bei einigen Tieren volle Analgesie, bei allen anderen eine deutliche Abschwächung der Schmerzempfindung herbeiführte. Ferner zeigte es sich, daß noch $^1/_{10}$ $^1/_{12}$ der Dosis, die volle Analgesie bei allen Tieren hervorrief, bei vielen Mäusen (30—50%) die Schmerzreaktion merklich abzuschwächen vermag.

Die Erklärung für diesen Unterschied zu den Befunden Hesses ist wohl darin zu sehen, daß bei den eigenen Versuchen die Morphinlösung nicht peroral, sondern subcutan appliziert und daß mit einer sehr großen Tierzahl gearbeitet wurde. Hierbei stellte es sich heraus, daß gelegentlich eine Gruppe von z. B. vier Mäusen nach Injektion von 0,006 mg Morphinhydrochlorid pro g Gewicht keine Abschwächung der Schmerzreaktion erkennen ließ, während bei einer anderen Gruppe einige, bei einer weiteren sämtliche Tiere eine deutliche Abschwächung zeigten. Ferner wurde bei diesen Versuchen besonders auf diese erste deutliche Abschwächung der Schmerzempfindung geachtet. Die Mäuse reagieren zwar noch deutlich auf das von Hesse beschriebene Anlegen der Klemme, doch ist die Abwehrreaktion stark verlangsamt und weniger heftig als normal. Schließlich spielt auch die verwandte Arterienklemme eine Rolle. Man benutzt daher zweckmäßig für sämtliche Versuche das gleiche Instrument.

Dicodidhydrochlorid besitzt nach der Tabelle nahezu die gleiche analgetische Wirkung wie Morphin. Dies trifft im wesentlichen zu, jedoch ist die Wirkung weniger zuverlässig.

Die analgetische Wirkung von Dilaudid ist erheblich stärker als die vom Morphin, sie beträgt das 10- 12fache, wenn man die Dosen, die volle Analgesie bewirken, miteinander vergleicht. Die Spanne zwischen den

Gaben, die volle Analgesie, und denen, die gerade eine Abschwächung der Schmerzreaktion hervorrufen, ist etwas kleiner als bei Morphin.

Auch Eukodal wirkt erheblich stärker (7—8fach) analgetisch als Morphin. Die Wirkung tritt zudem deutlich rascher ein (in 5—10 Minuten statt in 15—20 Minuten), hält aber erheblich kürzere Zeit an. So dauert die Abschwächung der Schmerzreaktion nach kleinen und mittleren Dosen (0,002—0,005 mg pro g Maus) bei den meisten Tieren nur 20—30, selten 45—60 Minuten lang an, während die Morphinwirkung bei entsprechenden Dosen wesentlich länger (1—2 Stunden) anhält und dann — auch im Gegensatz zu Eukodal — ganz allmählich abklingt.

Die analgetische Wirkung des Codeins ist nur gering. Volle Analgesie läßt sich durch dieses Alkaloid nur bei wenigen Tieren erzielen.

Bei der therapeutischen Anwendung von Morphinderivaten ist die Nebenwirkung auf das Atemzentrum insbesondere bei manchen Kampfstoffvergiftungen bedenklich. Es erscheint daher naheliegend, Morphin und seine Derivate eventuell mit einem Analepticum zu kombinieren. In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher geprüft, wie sich die Verabfolgung von Cardiazol auf die analgetische Wirksamkeit der verschiedenen Alkaloide auswirkt. Hierbei zeigte es sich, daß die subcutane Injektion von Cardiazol in Dosen von 0,0001—0,002 mg pro g Maus keinen deutlichen Einfluß auf die Schmerzaufhebung durch die geprüften Morphinderivate ausübt.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Es ist leider besonders bei Morphin und seinen Derivaten bisher nur mit Vorbehalt möglich, aus Tierversuchen Schlüsse auf das Verhalten am Menschen zu ziehen. Trotzdem läßt sich feststellen, daß es nicht richtig ist, die therapeutische Anwendung von Morphin wegen der Gefahr der Atmungslähmung zu verbieten und an seiner Stelle Eukodal zu empfehlen. Es kann kein Zweifel darüber bestehen, daß Eukodal die Atmung erheblich (beim Tier etwa 6—8fach) stärker lähmt als Morphin (vgl. auch Biberfeld [7]). Die analgetische Wirksamkeit ist zwar ebenfalls wesentlich stärker als die des Morphins, doch ist diese Wirksamkeitssteigerung nicht größer als die Zunahme der atemlähmenden Wirkung. Hinzu kommt, daß die analgetische Wirkung des Eukodals zwar auffällig rasch eintritt, wie auch andere Autoren betonen (vgl. z. B. Wohlgemuth [8]), dafür aber auffällig flüchtig ist.

Dicodid wirkt etwas stärker atmungslähmend als Morphin; seine analgetische Wirkung ist nach der Tabelle 6 annähernd ebenso stark wie die des Morphins, tatsächlich ist sie jedoch weit weniger zuverlässig, ein Befund, der den Beobachtungen Hesses (l. c.) entsprechen dürfte.

[7] Biberfeld: Biochem. Z. **111**, 91 (1920). — [8] Wohlgemuth, H.: Ther. Gegenw. **59**, 287 (1918).

Von Gottlieb[9] wurde übrigens dem Dicodid eine Wirkung auf die Schmerzempfindung ganz abgesprochen, während nach Hildebrandt[10] Dicodid wesentlich stärker analgetisch wirken soll als Morphin.

Dilaudid hat nach den beschriebenen Versuchen wesentlich günstigere Eigenschaften, da es etwa 10fach stärker analgetisch und nur 4—5fach stärker atmungslähmend wirkt als Morphin. Auch Gottlieb[9] gibt an, daß die Wirkung von Dilaudid auf das Atemzentrum 3—4mal stärker ist als die Wirkung von Morphin. Wright[11] stellte jedoch bei Dilaudid eine 10fach stärkere Wirkung auf die Atmung fest, so daß hiernach bei Dilaudid die Zunahme der analgetischen Wirksamkeit mit der Zunahme der schädlichen Wirkung auf die Atmung parallel gehen würde (vgl. auch Albricht[12]). Bei den oben beschriebenen Versuchen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden.

Codein hat nur eine sehr geringe lähmende Wirkung auf das Atemzentrum. Leider ist aber auch die analgetische Wirkung ziemlich unerheblich. Eigenartigerweise kommen jedoch bei größeren Versuchsreihen nicht ganz selten Tiere vor, die nach relativ kleinen Codeindosen eine sehr beträchtliche Herabsetzung der Schmerzempfindung (bis zur vollständigen Analgesie) erkennen lassen.

Diesem Befund entspricht die Beobachtung, daß bei manchen Menschen Codein enthaltende Antineuralgica des Handels unverhältnismäßig stark analgetisch wirken, so daß sie hier bis zu einem gewissen Grade Morphin zu ersetzen vermögen.

Zusammenfassung:

Morphin, Dicodid, Dilaudid, Eukodal und Codein wurden im Tierversuch in bezug auf atemlähmende, analgetische und allgemein toxische Wirkungen miteinander verglichen.

Hierbei zeigte es sich, daß Eukodal deutlich stärker analgetisch, gleichzeitig aber auch in etwa gleichem Maße stärker lähmend auf das Atemzentrum wirkt als Morphin.

Die Wirkung des Dicodids auf die Schmerzempfindung ist etwas schwächer und außerdem weniger zuverlässig als die des Morphins. Die atemlähmende Wirkung ist deutlich stärker.

Dilaudid wirkt 4—5mal stärker atemlähmend und etwa 10mal stärker analgetisch als Morphin.

Codein hat nur eine verhältnismäßig schwache Wirkung auf das Atemzentrum. Die analgetische Wirksamkeit ist gering, doch bestehen hierin größere individuelle Verschiedenheiten.

[9] Gottlieb, R.: Münch. med. Wschr. **1926**, S. 595. — [10] Hildebrandt, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **174**, 405 (1934). — [11] Wright, Ch. u. F. A. Barbour: J. J. Pharmacol. **53**, 34 (1935). — [12] Albricht, J. C.: Acta neerld. Physiol. etc. **9**, 109 (1939).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Hansischen Universität Hamburg.
(Direktor: Prof. Dr. Ed. Keeser.)

Über die thromboseverhütende Wirkung des Neodymacetats.

Von

Erich Vincke und Henry E. Never.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. November 1939.)

In der Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin **106**, 181 (1939) veröffentlichten Dyckerhoff und Goossens eine Arbeit über die thromboseverhütende Wirkung des Neodyms (Neodympräparat „Auer 144"). In dieser Arbeit beschäftigen sich die Autoren mehrfach mit früheren, gemeinsam mit Oelkers veröffentlichten Untersuchungen des einen von uns (Vincke) über die Pharmakologie der seltenen Erden, wozu wir folgendes ausführen möchten:

Die Art, in welcher Dyckerhoff und Goossens die Literatur über seltene Erden zitieren, ergibt ein durchaus falsches Bild hinsichtlich der Ergebnisse, welche bis zu dem Zeitpunkt vorlagen, als die erste Arbeit von Dyckerhoff und Mitarbeitern über seltene Erden erschien. Dies gilt auch insbesondere hinsichtlich der blutgerinnungshemmenden Eigenschaft der seltenen Erden.

Dyckerhoff und Goossens geben an (l. c. S. 182), Guidi[1] habe beobachtet, „daß nach Neodyminjektion die Einstichstelle besonders stark nachblutet" und habe daraus auf eine Verlängerung der Blutgerinnungszeit geschlossen, „ohne dieser Beobachtung weiter nachzugehen". Tatsächlich gibt jedoch Guidi (l. c. S. 333) ausführliche Protokolle seiner Versuche in vitro über die blutgerinnungshemmende Wirkung des Neodymchlorids bei Hundeblut.

Die Arbeit von Guidi ist aber nicht einmal die erste aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Florenz, die sich im Verlauf von Untersuchungen über die Pharmakologie seltener Erden mit deren blutgerinnungshemmender Wirkung befaßte. So fand bereits Aiazzi-Mancini[2] in Versuchen in vitro eine sehr ausgeprägte gerinnungshemmende Wirkung des Lanthanchlorids; Niccolini beobachtete einen gleichsinnigen Einfluß des Praseodymchlorids[3] und des Samariumchlorids[4].

[1] Guidi, G.: Arch. internat. Pharmacodynam. **37**, 305 (1930). — [2] Aiazzi-Mancini, M.: Arch. di Fisiol. **25**, 257 (1927). — [3] Niccolini, P. M.: Arch. internat. Pharmacodynam. **37**, 199 (1930). — [4] Niccolini, P. M.: Arch. internat. Pharmacodynam. **40**, 247 (1931).

Die italienischen Forscher fanden, daß bereits geringe Konzentrationen der genannten seltenen Erden in vitro blutgerinnungshemmend wirken. Daraus geht eindeutig hervor, daß Dyckerhoff und Mitarbeiter die Priorität für diese Entdeckung nicht beanspruchen können.

Dyckerhoff und Goossens fahren nach der Bemerkung über Guidi folgendermaßen fort: „In umfangreichen Versuchen konnten wir inzwischen nachweisen (l. c.), daß sämtliche untersuchten Glieder der Gruppe der seltenen Erden die Blutgerinnung in vitro und in vivo schon in kleiner Konzentration verzögern." Hiernach muß man annehmen, daß die Autoren Untersuchungen mit Salzen von zumindest mehreren der 17 Elemente der Gruppe der seltenen Erden angestellt haben. Tatsächlich finden sich jedoch in der zitierten Arbeit[5] nur Versuche in vitro und in vivo mit Neodymsalzen wiedergegeben*.

In der 1937 über die Wirkung seltener Erden auf die Blutgerinnung gemeinsam mit Oelkers veröffentlichten und übrigens hinsichtlich der Autoren von Dyckerhoff und Goossens mehrfach falsch zitierten Arbeit des einen von uns[6] wurden nun demgegenüber ausführliche systematische Versuche in vivo und in vitro über die Wirkung der Chloride des Lanthans, Cers, Lanthandidyms, Praseodyms und Neodyms auf die Blutgerinnung mitgeteilt. Wir konnten dabei unter anderem verschiedene Befunde von Kürten[7] nicht bestätigen. Wegen des in Frage stehenden Problems der Thromboseprophylaxe müssen wir hierauf etwas näher eingehen.

Kürten teilte z. B. mit, daß er bei einem Kaninchen nach der intravenösen Injektion von 30 mg Neodymchlorid (also etwa 10 mg/kg Körpergewicht) eine deutliche Verlängerung der Blutgerinnungszeit auch noch 40 Stunden nach der Injektion bemerkte. Wir konnten demgegenüber bei dieser Dosis bei Kaninchen nur einen geringfügigen Einfluß auf die Blutgerinnung bemerken, der außerdem nur etwa 4 Stunden anhielt. Selbst bei intravenöser Injektion von 50 mg Lanthan-, Cer-, Praseodym- oder Neodymchlorid pro kg Körpergewicht ist, wie wir seinerzeit fanden, die Gerinnungszeit bei Kaninchen 24 Stunden nach der Injektion stets wieder völlig normal.

Wir freuen uns, feststellen zu können, daß Dyckerhoff und Goossens in ihrer jetzigen Veröffentlichung (l. c. S. 185, Tabelle 3) Zahlen mitteilen, aus denen hervorgeht, daß sogar nach Injektion von 200 mg „Auer 144" pro Kaninchen (also etwa 50—60 mg Neodymacetat pro kg Körpergewicht) die Blutgerinnungszeit nach 24 Stunden praktisch wieder völlig normal ist.

* Auch in der Mitteilung von Dyckerhoff und Kürten [Biochem. Z. **284**, 111 (1936)] wird von seltenen Erden nur das Neodym erwähnt. [Das in der Arbeit ebenfalls genannte Thor rechnet man neuerdings weder chemisch (vgl. Gmelins Handb. d. anorg. Chemie, 8. Aufl., System-Nr. 39, S. 1, Verlag Chemie, Berlin 1938) noch pharmakologisch (vgl. H. Steidle in Handb. exper. Pharmak. III. Bd., 4. Teil, S. 2189, Julius Springer, Berlin 1935) zu den seltenen Erden].

[5] Dyckerhoff, H., W. v. Behm, N. Goossens u. H. Miehler, Biochem. Z. **288**, 271 (1936). — [6] Vincke, E., u. H.-A. Oelkers: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 594 (1937). — [7] Kürten, H. F.: Z. exper. Med. **99**, 112 (1936).

Selbst wenn man aber, wie dies Dyckerhoff und Goossens mehrfach tun, den Begriff „seltene Erden" mit dem Element Neodym identifiziert, ist es, wie aus dem vorstehend Gesagten einwandfrei hervorgeht, sowohl sachlich unrichtig als auch eine unlogische sprachliche Ausdrucksweise, zu sagen (l. c. S. 183), wir hätten 1937 die 1939 veröffentlichten Versuche von Dyckerhoff und Goossens „bestätigt".

Dyckerhoff und Goossens geben weiter an (l. c. S. 183), daß sich von den seltenen Erden als unschädlichstes Element das Neodym erwies. Selbst wenn wir davon absehen, daß die Autoren einen Beweis für diese Behauptung durch Wiedergabe von Versuchen schuldig bleiben, ist ihre Angabe auch tatsächlich unrichtig.

Wie wir[8] seinerzeit zeigten, liegen — unter bestimmten Bedingungen hinsichtlich der Injektionsgeschwindigkeit und der Konzentration der Lösungen — bei intravenöser Injektion die letalen Dosen für die Chloride von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym übereinstimmend zwischen 200—250 mg/kg Kaninchen. Auch bei subcutaner Applikation weicht die Toxizität der genannten Chloride nicht sehr wesentlich voneinander ab.

Dyckerhoff und Goossens empfehlen statt Neodymchlorid oder -sulfat die Anwendung des in „Auer 144" enthaltenen Neodymacetats zur Thromboseprophylaxe. Wir haben im letzten Jahre eine große Anzahl organischer Verbindungen seltener Erden — u. a. auch Neodymacetat — dargestellt und pharmakologisch ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden demnächst ausführlich veröffentlicht werden. Unsere Befunde, welche das Neodymacetat betreffen, sollen jedoch schon jetzt mitgeteilt werden, soweit sie das hier in Frage stehende Problem der Thromboseprophylaxe berühren.

Um eine Verbindung zur wirksamen Thromboseprophylaxe verwenden zu können, muß sie in nicht toxischen Dosen die Blutgerinnungszeit wesentlich erhöhen; diese Hemmung der Blutgerinnung sollte möglichst so lange anhalten, daß man mit ein bis zwei Injektionen pro Tag auskommt.

Als Fazit der Arbeit von Dyckerhoff und Goossens darf die Empfehlung angesehen werden, als Anfangsdosis zur Thromboseprophylaxe beim Menschen etwa 250 mg und maximal 500 mg Neodymacetat pro die zu injizieren. Die erstgenannte Dosis entspricht nach Dyckerhoff und Goossens 4 mg des Neodymsalzes pro kg Körpergewicht. Nun wirkt zwar diese Dosis nicht toxisch, aber sie erhöht auch leider — entgegen den Angaben von Dyckerhoff und Goossens — die Blutgerinnungszeit nicht. Diese Behauptung kann ohne weiteres durch die Daten einer von Dyckerhoff und Goossens (l. c. S. 191, Tabelle 7) wiedergegebenen „herausgegriffenen Injektionsserie" erhärtet werden. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, betrug bei einer Patientin, deren Körpergewicht leider nicht

[8] Vincke, E., u. H.-A. Oelkers: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 465 (1938).

angegeben ist, die nach Fonio[9] bestimmte Blutgerinnungszeit z. B. $1^1/_2$ Stunden nach der Injektion von 150 mg „Auer 144" 17 Minuten, während sie vor der Injektion 11 Minuten betrug. $2^1/_2$ Stunden nach der Injektion von 450 mg „Auer 144" belief sich die Blutgerinnungszeit auf 23 Minuten gegen 13 Minuten vor der Injektion. Dyckerhoff und Goossens ziehen den Schluß, daß die Gerinnungszeiten des Blutes „deutlich verlängert" waren. Unseres Erachtens liegen jedoch die beobachteten Werte der Gerinnungszeiten durchaus innerhalb derjenigen, die man mit der genannten Methode am normalen menschlichen Blut erhält. Wir befinden uns mit dieser Ansicht in Übereinstimmung mit Fonio, der angibt (l. c. S. 362), daß nach seiner Methode die Gerinnungszeit für Normalblut bei 15° 25—32 Minuten beträgt. Auch die von Dyckerhoff und Goossens bei dieser Gelegenheit wiedergegebenen — zwischen 2 Min. 45 Sek. und 5,50 Min. gelegenen — Gerinnungszeiten für das rekalzifizierte Oxalatplasma sprechen nicht für eine irgendwie ins Gewicht fallende Verlängerung der Blutgerinnungszeit*.

Obwohl sich aus dem vorstehend Gesagten bereits einwandfrei die Wirkungslosigkeit einer Injektion von etwa 4 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht ergibt, haben wir zur Sicherheit auch noch Tierversuche über diesen Gegenstand angestellt. Das Präparat „Auer 144" wurde uns liebenswürdigerweise von der Auergesellschaft, Berlin, als 10%ige Lösung zur Verfügung gestellt. Als Versuchstiere verwandten wir Kaninchen von 2—3 kg Gewicht, die 18—24 Stunden gehungert hatten. Das Präparat wurde entsprechend der Forderung von Dyckerhoff und Goossens (l. c. S. 191) vor der Injektion verdünnt, und zwar 1 : 3 mit 10%iger steriler Traubenzuckerlösung. Nach der intravenösen Injektion (Ohrvene) wurde die Gerinnungszeit am Gesamtblut nach dem Verfahren von Riesser und Nagel[10] (vgl. auch Vincke und Oelkers[6]) bei 25° bestimmt. Die normale Gerinnungszeit beträgt bei diesem Verfahren für Kaninchen etwa 3—5 Min. Unsere Versuche sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Wie aus dieser Tabelle ebenfalls hervorgeht, sind 4 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht ohne jeden Einfluß auf die Blutgerinnung. 10 mg des Salzes pro kg erhöhen zuweilen die Gerinnungszeit geringfügig für kurze Zeit. Bei einer Dosis von 25 mg des Salzes pro kg ist die Gerinnungszeit 6 Stunden nach der Injektion noch erhöht (Versuch 5 und 6), jedoch 12 Stunden nach der Injektion wieder völlig normal (Versuch 9 und 10). Auch bei einer Dosis von 50 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht ist die Gerinnungszeit des Blutes nach 12 Stunden nicht mehr erhöht (Versuch 11

* Dyckerhoff, Goossens u. Schwantke [Z. exper. Med. **105**, 145 (1939)] geben selbst an, daß beim gesunden Menschen mit dieser Methode Gerinnungszeiten zwischen 2 und 4 Minuten gefunden werden.

[9] Fonio, A.: in Handb. d. norm. u. pathol. Physiologie, Bd. VI, 1. Hälfte, S. 307. Julius Springer, Berlin 1928. — [10] Riesser, O., u. A. Nagel: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **179**, 743 (1935).

Tabelle 1.

Versuchsnummer	Verbindung	mg Verbindung pro kg Körpergewicht i.v.	Gerinnungszeit bei 25° in Minuten nach									
			0′	1′	5′	30′	1h	2h	4h	6h	12h	24h
1	Auer 144	4	3	4	4	4	4	4	5	5	—	4
2	„ 144	4	6	—	6	4	4	2	4	4	—	3
3	„ 144	10	3	2	4	4	4	4	4	3	—	4
4	„ 144	10	5	8	13	8	11	9	8	7	—	6
5	„ 144	25	3	12	35	19	12	12	12	9	—	4
6	„ 144	25	3	4	5	14	13	13	13	11	—	5
7	„ 144	50	4	6	>7h	63	42	—	32	10	—	4
8	„ 144	50	5	10	>7h	38	40	35	12	9	—	5
9	„ 144	25	3	—	—	—	—	—	—	—	3	—
10	„ 144	25	3	—	—	—	—	—	—	—	4	—
11	„ 144	50	3	—	—	—	—	—	—	—	5	—
12	„ 144	50	3	—	—	—	—	—	—	—	4	—
13	Neodymacetat	50	3	4	9	20	107	120	48	12	—	5
14	$Nd(CH_3COO)_3 \cdot H_2O$	50	4	90	>7h	—	>7h	150	12	10	—	4

und 12). Bei Verwendung von Neodymacetat erhielt man dasselbe Ergebnis wie mit „Auer 144“: wie sich aus Tabelle 1 ergibt, ist auch nach Injektion von 50 mg Neodymacetat die Blutgerinnungszeit nach 6 Stunden nur noch schwach erhöht (Versuch 13 und 14). Das zu diesen Versuchen benutzte Neodymacetat wurde von uns aus Neodymhydroxyd durch Lösen in heißer überschüssiger Essigsäure und Umkristallisieren aus heißem Wasser hergestellt[11]. Es wurde als 1%ige Lösung (in physiologischer Kochsalzlösung gelöst) injiziert.

Aus den Versuchen der Tabelle 1 ergibt sich also — soweit man überhaupt im Tierversuch gewonnene Zahlen auf die Verhältnisse des menschlichen Organismus übertragen kann —, daß man täglich mindestens 3 Injektionen von 25, besser aber 50 mg „Auer 144“ pro kg Körpergewicht vornehmen müßte, um mit Sicherheit die Blutgerinnungszeit dauernd erhöht halten zu können. Eine Dosis von 50 mg „Auer 144“ oder Neodymacetat pro kg macht aber häufig das Blut vorübergehend praktisch ungeronnen (Versuch 7, 8 und 14). Es ist dies ein Zustand, der sicherlich nicht unbedenklich ist (Gefahr von Nachblutungen bei Frischoperierten), besonders wenn er während längerer Zeit besteht. Die fortgesetzte Applikation einer Dosis von 50 mg Neodymacetat oder „Auer 144“ pro kg Körpergewicht verbietet sich auch deshalb, weil eine solche Einzeldosis bereits häufig recht toxisch wirkt.

Über die Pharmakologie und die Toxikologie der seltenen Erden liegt eine große Anzahl von Beobachtungen vor; systematische Untersuchungen über diesen Gegenstand wurden u. a. von Steidle und Mitarbeitern und dem Florentiner Arbeitskreis ausgeführt [Literatur bei Steidle (l. c.)]. Von

[11] Gmelin-Krauts Handb. anorg. Chem. Bd. VI, Abt. 2, S. 421. C. Winter. Heidelberg 1932.

Dyckerhoff und Goossens wurden unseres Wissens in der vorliegenden Arbeit zum ersten Male ausführlichere pharmakologische Befunde mitgeteilt. So erfreulich es auch für uns ist, daß das Ergebnis der Untersuchungen von Dyckerhoff und Goossens mit demjenigen unserer 1937/38 veröffentlichten Arbeiten übereinstimmt, müssen wir doch die Interpretation der beiden Autoren (l. c. S. 187), wir hätten damit ihre — erst heute veröffentlichten — Befunde „ergänzt", ablehnen.

Hinsichtlich der Verträglichkeit von „Auer 144" geben Dyckerhoff und Goossens (l. c. S. 186) Versuche an drei Kaninchen wieder. Zur Beurteilung benutzen sie das äußerliche Verhalten der Tiere und die Kontrolle ihres Gewichts. Die Autoren wurden vor allem durch den Versuch mit dem als „Kaninchen Nd VIII" bezeichneten Tier (l. c. S. 189) zu klinischen Versuchen ermutigt. Es handelt sich hierbei um ein schwer krankes Tier, da sich bei seiner Sektion statt der rechten Lunge „eine dickwandige Cyste mit zähem, breiigem, weißem Inhalt" (l. c. S. 186) fand.

Es ist u. E. unmöglich, aus solchen Versuchen die Berechtigung zu klinischen Prüfungen abzuleiten. Hierzu ist eine gründliche pharmakologische Analyse notwendig.

Eine der wichtigsten pharmakologischen Eigenschaften der seltenen Erden ist ihre lähmende Wirkung auf das Herz. Für die Beurteilung der Eignung von Salzen seltener Erden als Thromboseprophylacticum ist deshalb die Feststellung der herzschädigenden Dosis sehr wichtig.

Die Prüfung der Herzwirkung des Neodymacetats und des Präparates „Auer 144" wurde an Katzen in Urethannarkose (1,25 g Urethan pro kg Körpergewicht) vorgenommen. Wir verwandten dabei folgendes Verfahren:

Das Versuchstier wird in Rückenlage aufgebunden. Freilegung einer Vena jugularis und Einbinden einer Kanüle zur Injektion der Versuchslösung. Eröffnung der Trachea und Einführen einer Glaskanüle, durch die das Tier in der üblichen Weise mit der Starling-Pumpe beatmet wird. Nach Freipräparieren des Brustbeins wird der Thorax zur Vermeidung größerer Blutungen mittels Durchtrennen der medianen Linie des Brustbeins eröffnet. Nach Einführen eines Rippensperrers in den offenen Thorax wird der Herzbeutel eröffnet. Zur Registrierung der Herzbewegungen wird die Herzspitze an ein Häkchen angehakt, das an einem Faden hängt; das andere Ende des über Rollen laufenden Fadens ist am Schreibhebel befestigt, der auf dem Kymographion die Herzbewegungen aufzeichnet. Die Belastung des Herzens betrug im allgemeinen 20 g.

Bei dieser Versuchsanordnung werden neben den Herzschlägen die durch die Starling-Pumpe hervorgerufenen Atemzüge aufgezeichnet. Die Amplitude der Herzschläge ist ein Maß für das Herzvolumen: eine Herzdilatation macht sich beispielsweise in einer Verkleinerung der Amplitude bemerkbar. Tritt nach Injektion einer Substanz Schnappatmung auf, so kann man diese infolge der besonders großen Ausschläge leicht von den Atemzügen unterscheiden, welche durch die Starling-Pumpe verursacht werden.

Bei der Prüfung der Herzwirkung des Neodymacetats zeigte sich, daß durch intravenöse Injektion von 50 mg Neodymacetat pro kg Körpergewicht (als 1 %ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung) eine Schädigung des Katzenherzens bewirkt wird, die unter Umständen sogar zum Tode führt. So traten z. B. nach Injektion von 50 mg Neodymacetat pro kg Körpergewicht bei einer Katze von 2.7 kg Gewicht kurze Zeit nach Beginn der Injektion — etwa nach 1 Minute — Dilatation des Herzens (besonders des rechten Ventrikels), vereinzelte Schnappatmung und Verlangsamung des Pulses ein (Abb. 1). Nach kurzer Erholung kam es allmählich wieder zu

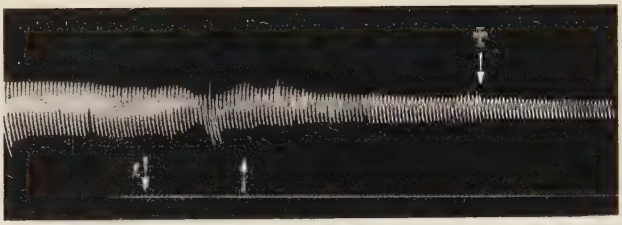


Abb. 1. Katze, 2,7 kg. 1:50 mg Neodymacetat pro kg Körpergewicht. Belastung 20 g. Zeitschreibung 6 Sekunden.

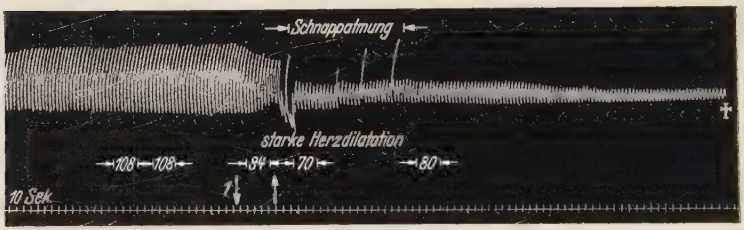


Abb. 2. Katze, 3,6 kg. 1:50 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht. Belastung 20 g. Zeitschreibung 10 Sek.

Herzdilatation, worauf unter Verlangsamung des Pulsschlages der Exitus eintrat, 6 Minuten nach Ende der Injektion.

Die Herzwirkung von „Auer 144" wurde in zwei Versuchen an Katzen geprüft. Die 10 %ige Lösung des Präparats wurde vor der Injektion mit 10 %iger steriler Traubenzuckerlösung 1 : 3 verdünnt. Während der innerhalb 1 Minute erfolgten Injektion von 50 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht kommt es zu einem Pulsabfall von 108 auf 84; wenige Sekunden nach Beendigung der Injektion treten Schnappatmung, starke Herzdilatation und Verlangsamung des Pulsschlages auf 70 ein. Eine Erholung erfolgt nicht. Unter abnormer Herzdilatation tritt der Tod 10 Minuten nach Beendigung der Injektion ein (Versuch 1, Abb. 2). Im zweiten Versuch (Abb. 3) wurden 50 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht langsamer als in Versuch 1 — während etwa 2 Minuten — injiziert. Während der Injektion kommt es zu Schnappatmung; nach Beendigung der Injektion tritt

akute Herzdilatation ohne Verlangsamung des Pulses ein. (Das Ausbleiben der Pulsverlangsamung wurde auch in manchen anderen Versuchen mit Neodymacetat beobachtet.) $3^1/_2$ Minuten nach Ende der Injektion ist völlige Erholung mit normaler Herztätigkeit eingetreten. Die zweite Injektion von 50 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht erfolgte innerhalb von einer halben Minute. Der Verlauf der Beeinflussung der Herztätigkeit war derselbe wie bei der ersten Injektion. Die dritte Injektion von 75 mg des Präparats pro kg Körpergewicht, die innerhalb von etwa 1 Minute erfolgte, bewirkte akute Dilatation mit Pulsverlangsamung; es folgte ihr eine vorübergehende, jedoch nicht vollständige Erholung. Nach 5 Minuten kam es dann zum Exitus des Tieres.

Zusammenfassend muß also festgestellt werden, daß eine Dosis von 50 mg Neodymacetat oder „Auer 144" pro kg Körpergewicht eine stark herzschädigende Wirkung zeigt, die manchmal sogar zum Herztod des Versuchstieres führt.

Abb. 3. 3 Katze, 3,35 kg. 1 und 2: 50 mg „Auer 144", 3: 75 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht. Belastung 20 g. Zeitschreibung 10 Sek.

Zusammenfassung.

1. Die Prüfung der blutgerinnungshemmenden Wirkung des als Thromboseprophylacticum vorgeschlagenen Präparates „Auer 144" ergab in Versuchen an Kaninchen, daß die empfohlene Dosis von 4 mg pro kg Körpergewicht ohne jeden Einfluß auf die Blutgerinnung ist. 25 mg „Auer 144" pro kg Körpergewicht erhöhen die Blutgerinnungszeit merklich für einige Stunden. 50 mg des Präparats pro kg Körpergewicht machen das Blut im Maximum der Wirkung für viele Stunden ungerinnbar. 12 Stunden nach der Injektion ist die Blutgerinnungszeit stets wieder völlig normal.

2. Eine Thromboseprophylaxe wäre unter Umständen durch eine dreimalige Injektion von je 50 mg „Auer 144" pro die und kg Körpergewicht möglich. Wie sich jedoch in Versuchen an Katzen ergab, verbietet sich die fortgesetzte Injektion dieser Dosis wegen ihrer stark herzschädigenden Wirkung.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Die Beziehung von Vaguswirkung und Blutdruck über die Steuerung des Potentialwirkungsmechanismus des Acetylcholins durch die Esterase.

Von

Fritz Zinnitz.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. November 1939.)

In einer früheren Arbeit[1] machte ich den Versuch, die Beziehungen von Vaguswirkung und Blutdruck mit Hilfe des Wirkungsmechanismus des Azetylcholins aufzuklären. Die damals vorgelegten Versuchsergebnisse brachten zwanglos den Nachweis dafür, daß als Antagonist des Sympathicus bzw. seines Überträgerstoffes des Adrenalins mit einem konstriktorischen Effekt auf die Gefäße der Parasympathicus bzw. das Azetylcholin eine dilatatorische Wirkung hat. Diese Feststellung bot einen Anhaltspunkt für das Vorhandensein einer parasympathischen Gefäßinnervation, die ja bereits aus der bekannten Tatsache der Aufhebung der blutdrucksenkenden Wirkung des Azetylcholins mittels des bekannten Vaguslähmers Atropin gefolgert worden ist.

Die Versuche wurden damals von der Vorstellung aus gemacht, daß bei einem niedrigen Blutdruck mit starkem Vagustonus mehr Azetylcholin zur Übertragung der parasympathischen Nervenwirkung am Wirkungsort des Gefäßnervensystems vorhanden sein müßte als bei hohem Blutdruck mit schwachem Vagustonus. Hieraus wurde weiterhin gefolgert, daß damit auch die Azetylcholinkonzentration bei hohem Blutdruck gegenüber niederem vermindert sein müßte. Um für diese Annahme experimentelle Unterlagen zu erhalten, wurden die Latenzzeiten von Azetylcholinwirkungen bei Einzelinjektionen am arteriellen Blutdruck von Katzen gemessen. Dabei stellte sich heraus, daß bei hohem Blutdruck mit schwachem Vagustonus bis zum Eintritt der Azetylcholinwirkung nur eine Latenzzeit von 2—3 Sekunden verstrich, während sie bei niederem Blutdruck bis zu 11 Sekunden dauerte. Dies wurde so gedeutet, daß der hohe Blutdruck mit schwachem Vagustonus eine geringere Azetylcholinkonzentration als der niedere Blutdruck mit starkem Vagustonus am Wirkungsort aufweisen muß, da diese das zusätzlich in die Blutbahn injizierte Azetylcholin erst längere Zeit ergänzen muß, um dann darüber hinaus die als Vagustonus

[1] Zinnitz, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 328 (1938).

bestehende Azetylcholinkonzentration bis zu einer zusätzlich freiwerdenden Vaguswirkung zu steigern. Wie sich die einzelnen Anteile bei der Erklärung dieser Latenzzeitunterschiede auf das Vaguszentrum und die peripheren cholinergischen Gefäßnervenendigungen verteilen, spielt bei den in dieser Arbeit mitgeteilten Versuchen keine Rolle.

Ein anderer maßgeblicher Faktor bei der chemischen Übertragung des parasympathischen Nervenreizes ist die Azetylcholinverseifungsgeschwindigkeit beim Abbau der Wirkung. Bereits bei den oben[1] angeführten Versuchen konnte festgestellt werden, daß bei hohem Blutdruck die Verseifung des Cholinesters schneller vor sich ging als bei niederem. Dieser Befund führte zu der Annahme, daß bei hohem Blutdruck mit schwachem Vagustonus mehr Esterase-Azetylcholin zur Wirkung kommt als bei niederem mit starkem Vagustonus. Es verschiebt sich also das Verhältnis der Reaktionsteilnehmer Azetylcholin und spaltendes Ferment mit sinkendem Blutdruck auf Kosten der Verseifungsgeschwindigkeit, die mehr und mehr abnimmt. Hieraus kann weiterhin gefolgert werden, daß durch die größere Inanspruchnahme des esterspaltenden Ferments bei der Bildung des starken Vagustonus eines niederen Blutdrucks die freiwirksame Esterase eingeschränkt wird und somit eine Herabsetzung der Verseifungsgeschwindigkeit entsteht. Analysiert man diese Verschiebung des Mengenverhältnisses Azetylcholin : freiwirksame Esterase noch weiterhin, so scheint sich im lebenden Organismus für eine bestimmte Blutdruckhöhe ein bestimmtes dynamisches Gleichgewicht mit einem bestimmten Mengenverhältnis der beiden Reaktionsteilnehmer Azetylcholin und spaltendes Ferment einzustellen. Die Geschwindigkeit der Einstellung dieses Gleichgewichts unterliegt dem Einfluß der Fermentwirkung. Die Lage des Gleichgewichts dagegen ist außerdem von der am Wirkungsort gebildeten Azetylcholinmenge abhängig.

Aus diesen Erwägungen heraus wurden die Versuche in dieser Arbeit angestellt, bei denen bei hohem, mittlerem und niederem Blutdruck die Esterasemenge im Blutserum von Katzen bestimmt wurde.

Methode.

Blutdruckmessung.

Die Versuche wurden an mit 70 mg pro kg Körpergewicht Chloralose narkotisierten Katzen, deren Kreislauf ungeschädigt war, ausgeführt. Der arterielle Blutdruck wurde in der Carotis mit der Trendelenburgschen Methode der Gegenstrominfusion gemessen und mit einem Quecksilbermanometer fortlaufend registriert. Es sei schon hier erwähnt, daß die Zufuhr des Natriumcarbonats in die Blutbahn während der Gegenstrominfusion, was die von uns verwendeten Mengen betrifft, keinen Einfluß auf den Spaltungsablauf bei der Azetylcholinhydrolyse hatte, wie in eigens hierzu gemachten Versuchen festgestellt werden konnte. Die zugeführte Menge Natriumcarbonat entsprach einem feinsteingestellten Quecksilberstrome.

Die Esterasebestimmung nach dem Prinzip der Warburg-Methode.

Der Cholinesterasegehalt des Blutserums von Katzen wurde nach dem Prinzip der Warburg-Methode, wie es von Ammon[2] angegeben worden ist, bestimmt. Die fermentative Azetylcholinhydrolyse wurde verfolgt, indem Ester und Ferment in einer bicarbonathaltigen Krebsringerlösung[3], die gleichzeitig mit Kohlensäure gepuffert war, zusammengebracht wurden. Wird durch die Anwesenheit von Ferment bei der Spaltung von Azetylcholin Essigsäure frei, so treibt diese eine äquivalente Menge Kohlensäure aus, die manometrisch bestimmt wird. Im Verlaufe von 3 Stunden wurde jede 30. Minute die freiwerdende Menge an Kohlensäure in cmm abgelesen und die Werte in den Abbildungen graphisch dargestellt. Bei der Durchführung der Versuche wurden die Nicolai-Tröge benutzt, bei denen man Substrat- und Fermentlösungen getrennt einfüllen und jederzeit während des Versuchs im Wasserbad mischen kann. Die Versuchstemperatur des Thermostaten wurde auf 37,4° C gehalten. Bei der großen Anzahl der Einzeluntersuchungen einer Versuchsreihe wurde ein Wasserbad von 300 Liter Inhalt benutzt, bei dem größere Temperaturschwankungen mit Hilfe einer von Heuwing[4] hierzu konstruierten Rührvorrichtung, die im Anhang zu dieser Arbeit beschrieben werden soll, vermieden wurden. Als Lösungs- und Verdünnungsmittel diente zu allen Versuchen eine stets frisch bereitete Krebsringerlösung, die mit Bicarbonat und Kohlensäure so gepuffert war, daß sie einem p_H von 7,4 entsprach. Als Gasgemisch wurde das von Linde hergestellte Carbogen mit 5 Vol.% Kohlensäure benutzt.

Die einzelnen Versuche wurden so durchgeführt, daß je 2 ccm zur Hälfte mit Krebsringerlösung verdünntes Serum in das Ansatzstück des Troges pipettiert wurden. In den Trog kamen 3 ccm einer 0,5%igen Azetylcholinchloridkrebsringerlösung. Dann wurde in der Warburg-Apparatur während des Schüttelns die Fermentverdünnung des Blutserums 1 : 1 den 15 mg Substrat zugegeben. Das Gesamtvolumen in jedem Trog betrug so während des Versuchs 5 ccm. Die Gesamtkonzentration des Azetylcholinchlorids war danach 0,3% und die Gesamtserumkonzentration 20%. Für die Eigenhydrolyse des Azetylcholinchlorids wurden unter den gegebenen Bedingungen Werte von höchstens 10 cmm CO_2 festgestellt, die bei den gefundenen Versuchsergebnissen stets unter der 10%igen Fehlergrenze lagen.

Zu allen Versuchen wurde nur frisch gewonnenes Katzenblut verwendet, das aus der Carotis in ein Sedimentierglas floß. Für den Einzelversuch wurden 2—2,5 ccm Blut entnommen, dessen Gerinnung mit Liquoid[5] gehemmt wurde. Bei jeder Bestimmung wurden von dem Liquoid 0,1 ccm einer 50 mg%igen Lösung gebraucht. In Kontrollversuchen ließ sich feststellen, daß dem Liquoid in der verwendeten Konzentration kein Einfluß auf den Spaltungsablauf des Azetylcholinchlorids beigemessen zu werden braucht. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme zentrifugiert. Es konnte festgestellt werden, daß auch der durch mehrmalige Abzapfungen entstandene größere Blutverlust der Tiere ohne nennenswerten Einfluß auf die Endergebnisse der Versuche war.

Elektrische Vagusreizung.

Zur Vagusreizung wurden Wechselströme benutzt, die in einem Schwingungskreis mit einem Frequenzbereich von 24—250 Hertz erzeugt wurden. Die Intensität der Reizung lag zwischen 0,1 und 7,0 Milliampère. Spannung und Intensität der

[2] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1933). — [3] Krebs, H. A., u. K. Henseleit: Z. physiol. Chem. **210**, 33 (1932). — [4] Hersteller der Rührvorrichtung: Feinmechanische Werkstätte des Pharmakologischen Institutes der Universität München. — [5] Für die freundliche Überlassung des Liquoids und des Azetylcholinchlorids bin ich der Firma Hoffmann-La Roche zu großem Danke verpflichtet.

Reizung konnten im Reizstromkreis fortlaufend gemessen werden. Die polarisierbaren Reizelektroden waren aus nicht rostendem Stahl. Die beiden Vagi wurden am Hals des Versuchstieres schonend mit dem Messer freigelegt.

Zur Dauerinfusion von Azetylcholinchlorid wurde eine einfache Glasapparatur, die im Anhang zu dieser Arbeit beschrieben werden soll, verwendet.

Besprechung der Versuche.

Versuche an Normalkatzen.

Spontane Blutdrucksenkung.

Die in Abb. 1 dargestellten Kurven zeigen den Ablauf der Verseifungszeiten für den Esterasegehalt der einzelnen Blutseren in Abständen von je

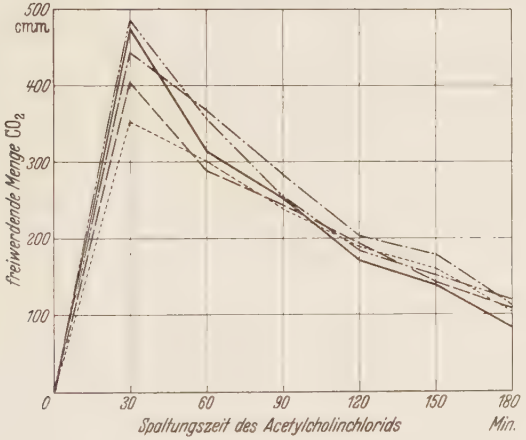


Abb. 1. Versuch vom 11. Juni 1939.

1. Serum, nach 2 Stunden Blutdruckhöhe 180 mm Hg.
2. Serum, nach 4 Stunden Blutdruckhöhe 150 mm Hg.
3. Serum, nach 6 Stunden Blutdruckhöhe 190 mm Hg.
4. Serum, nach 8 Stunden Blutdruckhöhe 70 mm Hg.
5. Serum, nach 10 Stunden Blutdruckhöhe 100 mm Hg.

Ordinate: Freiwerdende Menge CO_2 in cmm.
Abszisse: Spaltungszeit des Azetylcholinchlorids in Minuten.

30 Minuten für die ersten 3 Stunden nach der Herstellung des Blutzentrifugates an. Die Ordinate zeigt die freiwerdende Menge CO_2 in cmm und die Abszisse die Zeit der Azetylcholinchloridspaltung in Minuten an. Jede durch Strichelung und Punktierung besonders gekennzeichnete Linie läßt die Esterasewirkung für eine bestimmte Blutdruckhöhe erkennen. Aus dieser Darstellung kann man ersehen, daß durch die fermentative Wirksamkeit eines Blutserums bei 190 mm Hg Blutdruck infolge der Azetylcholinhydrolyse 485 cmm CO_2 frei werden, während es bei einem Blutdruck von 70 mm Hg nur 355 cmm CO_2 sind. Diese hier angegebenen Unterschiede entsprechen in ihrer Größenordnung bei allen Versuchen der Norm. Die größten Differenzen, die erreicht wurden, waren bei Esterasen im Blutserum

bei 240 mm Hg Blutdruck mit 510 cmm CO_2 und bei 35 mm Hg mit 337 cmm CO_2. Bei dem in Abb. 1 angeführten Versuch läßt sich in besonderem Maße die Einschränkung der Esterasewirkung in einzelnen Etappen parallel zur Senkung des Blutdruckes darstellen. Der Versuch dauerte 11 Stunden. Regelmäßig jede 2. Stunde vom Versuchsbeginn an wurde eine Blutentnahme gemacht. Trotz der langen Versuchsdauer machte sich kein Einfluß der infundierten Natriumcarbonatmenge auf den Spaltungsablauf des Azetylcholinchlorids bemerkbar. Das gleiche gilt für den Blutverlust nach fünfmaliger Blutentnahme, was aus der Numerierung der einzelnen Serumbestimmungen hervorgeht. Denn das stärkstwirksamste Serum wurde erst nach 6 Versuchsstunden abgenommen, während das schwächstwirksamste in der 8. Versuchsstunde nachgewiesen werden konnte. Wir schließen daraus, daß allein die bestehende Blutdruckhöhe maßgeblich für die Konzentration der Cholinesterase im Blutserum ist. Wie sich die Fermentkonzentration mit der Blutdruckhöhe ändert, zeigt der allmähliche Blutdruckabfall im Verlaufe des hier beschriebenen Versuchs sehr deutlich an. Die Esterase im Blutserum von 190 mm Hg setzt 485 cmm CO_2 in Freiheit, die von 180 mm Hg 475 cmm CO_2, die von 150 mm Hg 440 cmm CO_2, die von 100 mm Hg 405 cmm CO_2 und die von 70 mm Hg 355 cmm CO_2. Wir führen die zum Teil nur geringen Unterschiede hier deshalb mit an, weil bei mehreren Versuchen so charakteristische Befunde erhoben werden konnten.

Blutdrucksenkung durch elektrische Vagusreizung.

Man ersieht aus Abb. 2, daß bei einem Blutdruck von 205 mm Hg eine Fermentkonzentration im Blutserum besteht, die in den ersten 30 Minuten 570 cmm CO_2 frei macht. Wird dann bei dem Versuchstier der linke Vagus mit 0,4 mA 20 Minuten lang gereizt, so daß eine Dauerblutdrucksenkung, wie sie in Abb. 3 zu sehen ist, zustande kommt, dann nimmt der Esterasegehalt des Blutserums um mehr als ein Viertel ab. Steigert man dann den elektrischen Reiz bis auf 1,0 mA, so entsteht nach 10 Minuten Dauerreiz eine Einschränkung der Esterasewirkung um mehr als ein Drittel. Die Esterasewirkung von 570 cmm CO_2 wurde für einen Blutdruck von 205 mm Hg nachgewiesen. Durch die Vagusreizung mit 0,4 mA senkte sich der Blutdruck kontinuierlich um 35 mm Hg. Trotz der im Vergleich zu dem Versuch in Abb. 1 nur geringen Blutdrucksenkung von 35 mm Hg kommt es zu einer Einschränkung der Fermentwirkung von 570 cmm CO_2 auf 425 cmm CO_2. Dieser Verlust um mehr als ein Viertel an Wirksamkeit würde bei einem Versuch ohne elektrische Reizung, wie es in Abb. 1 der Fall ist, einer Blutdrucksenkung von mehr als 130 mm Hg entsprechen. Die noch stärkere Einschränkung der Esterase durch Reizung mit 1,0 mA bis auf 355 cmm CO_2 um mehr als ein Drittel bedeutet eine Wirkungsabnahme, die durch spontane Blutdrucksenkungen nie beobachtet werden konnte.

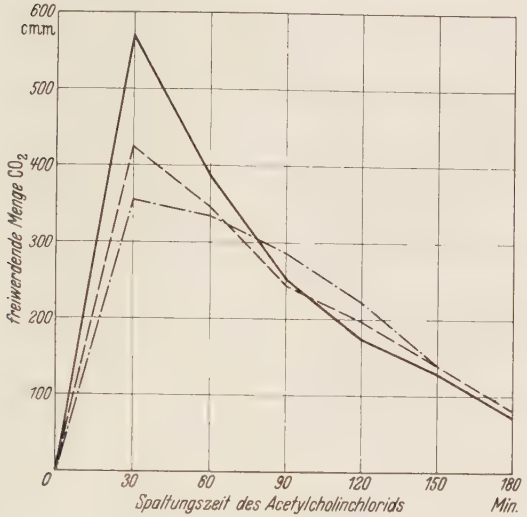


Abb. 2. Versuch vom 20. Juli 1939.

1. Serum, Normalwert ohne Vagusreizung, Blutdruckhöhe 205 mm Hg.
2. Serum, Reizung des linken Vagus mit 0,4 mA, Blutdruckhöhe 170 mm Hg.
3. Serum, Reizung des linken Vagus mit 1,0 mA, Blutdruckhöhe 158 mm Hg.

Ordinate: Freiwerdende Menge CO_2 in cmm.
Abszisse: Spaltungszeit des Azetylcholinchlorids in Minuten.

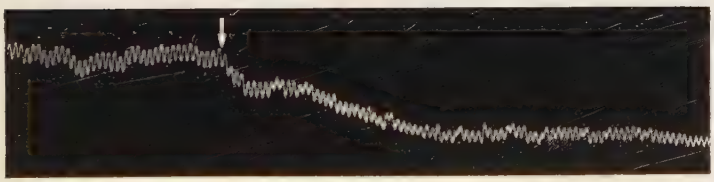


Abb. 3. Dauerreizung des linken Vagus mit 0,4 mA bei einem Blutdruck von 205 mm Hg.

Blutdrucksenkung durch Azetylcholindauerinfusion.

Es wurden dann weiterhin die Blutseren von Katzen untersucht, bei denen der Blutdruck durch Dauerinfusion mit Azetylcholinchlorid von 5,0 bis zu 12,0 γ pro Minute gesenkt wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, daß die Einschränkung der Cholinesterasewirkung unter der Dauerinfusion mit Azetylcholinchlorid gegenüber der bei der spontanen Blutdrucksenkung nicht gesteigert ist.

Bei der Durchführung dieser Versuche ließ sich außerdem feststellen, daß die Erholung aus der Chloralosenarkose im Verlaufe langdauernder Versuche ohne Einfluß auf die Esterasekonzentration im Blutserum ist. Sowohl bei tiefer wie bei oberflächlicher Narkose des Versuchstieres war der Fermentgehalt des Blutserums bei gleicher Blutdruckhöhe ständig derselbe.

Blutdrucksenkung durch kombinierte elektrische Dauerreizung des Vagus und Azetylcholinchloriddauerinfusion.

Abb. 4. a) Dauerinfusion mit 9,0 γ Azetylcholinchlorid pro Minute. b) Dauerreizung des rechten und linken Vagus mit 0,4 mA.

Um eine weitere Steigerung der Esterasehemmung zu erreichen, wurden Dauerreiz und Dauerinfusion kombiniert. Welch intensive und gleichmäßig verlaufende Dauerblutdrucksenkung in einem solchen Falle entsteht, zeigt Abb. 4. Sie stellt eine Dauerinfusion mit Azetylcholinchlorid von 9,0 γ pro Minute und eine Dauerreizung des rechten und linken Vagus mit 0,4 mA dar. Trotz der starken Intensität der blutdrucksenkenden Wirkung um 95 mm Hg, die in dieser Stärke bei Dauerblutdrucksenkungen bisher noch nicht bekannt ist, kommt es zu keiner wesentlichen Steigerung bei der Einschränkung der Esterasewirkung gegenüber den Befunden bei der Dauerreizung des linken Vagus mit 1,0 mA. Dieser Verlust an Wirksamkeit, der eine Einbuße von insgesamt einem Drittel der Cholinesterasewirkung bedeutet, gilt für alle Versuche als Maximalwert. Eine Steigerung über diesen Wert hinaus ist bisher nicht gelungen. Abb. 5 zeigt den Spaltungsablauf des Azetylcholinchlorids durch die Esterase des Blutserums vor, während und nach der in Abb. 4 demonstrierten Dauerblutdrucksenkung durch Dauerreiz und Azetylcholindauerinfusion. Man erkennt aus den Kurven, daß bei einem Blutdruck von 150 mm Hg 610 cmm CO_2 frei werden. Die Esterase des Blutserums bei Dauerinfusion und Dauerreiz, die bei einem Blutdruck von 40 mm Hg gewonnen wurde, entwickelt dagegen nur 415 cmm CO_2.

Dieser Versuch soll noch weiterhin zeigen, daß der Vorgang der Cholinesterasehemmung reversibel ist. Die nach dem Ausgleich der starken Blutdrucksenkung auftretende Blutdrucksteigerung um 40 mm Hg über den Ausgangsblutdruck bei der Bestimmung des Normalesterasegehalts zu Beginn des Versuchs hinaus geht ebenfalls mit einer gesteigerten Fermenttätigkeit einher, die von 610 cmm CO_2 bei der Normalesterasebestimmung bis auf 675 cmm CO_2 sich vermehrt. Nach dem Ausgleich dieser Blutdrucksteigerung bis auf das Niveau des Ausgangsblutdrucks zum Beginn des

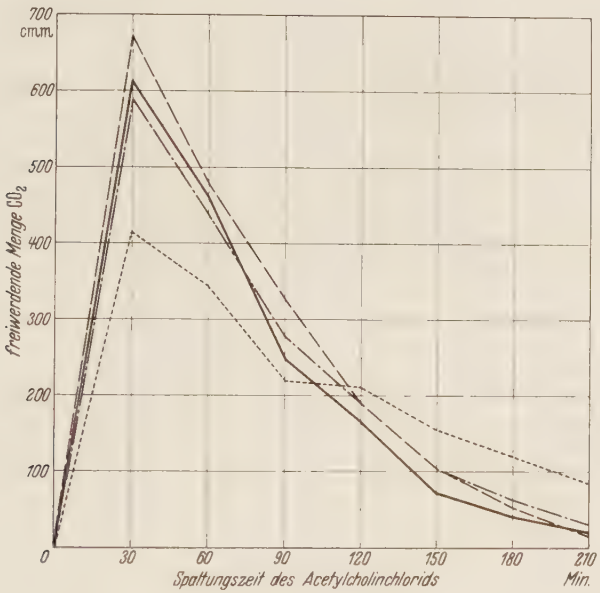


Abb. 5. Versuch vom 17. Juli 1939.

——— 1. Serum, Normalwert des Serumgehalts, Blutdruckhöhe 150 mm Hg.

. . . . . 2. Serum, Dauerinfusion mit 9,0; Azetylcholinchlorid pro Minute und Dauerreizung des rechten und linken Vagus mit 0,4 mA, Blutdruckhöhe 40 mm Hg.

— — — — 3. Serum, 30 Minuten nach Einstellung der Dauerinfusion und des Dauerreizes, Blutdruckhöhe 190 mm Hg.

. . . . 4. Serum, 2 Stunden nach der Einstellung von Dauerinfusion und Dauerreiz, Blutdruckhöhe 150 mm Hg.

Ordinate: Freiwerdende Menge CO_2 in cmm.
Abszisse: Spaltungszeit des Azetylcholinchlorids in Minuten.

Versuchs herab wurde der Esterasegehalt im Blutserum, nachdem 60 Min. lang der Blutdruck gleichmäßig eingestellt blieb, erneut festgestellt. Die Kurve in Abb. 5 zeigt, daß auch der Esterasegehalt wieder der gleiche geworden ist. Dies ergibt einen erneuten Beweis dafür, daß die Esterasekonzentration im Blutserum nur von der Höhe des Blutdrucks abhängig ist.

Die Veränderungen der Nachwirkungszeiten von Dauerblutdrucksenkungen infolge von Azetylcholindauerinfusionen in Abhängigkeit von der Höhe des Blutdrucks.

Bei der weiteren Suche nach Unterlagen experimenteller Art für die Richtigkeit der in den Abb. 1, 2 und 5 an der Einbuße der CO_2-Entwicklung

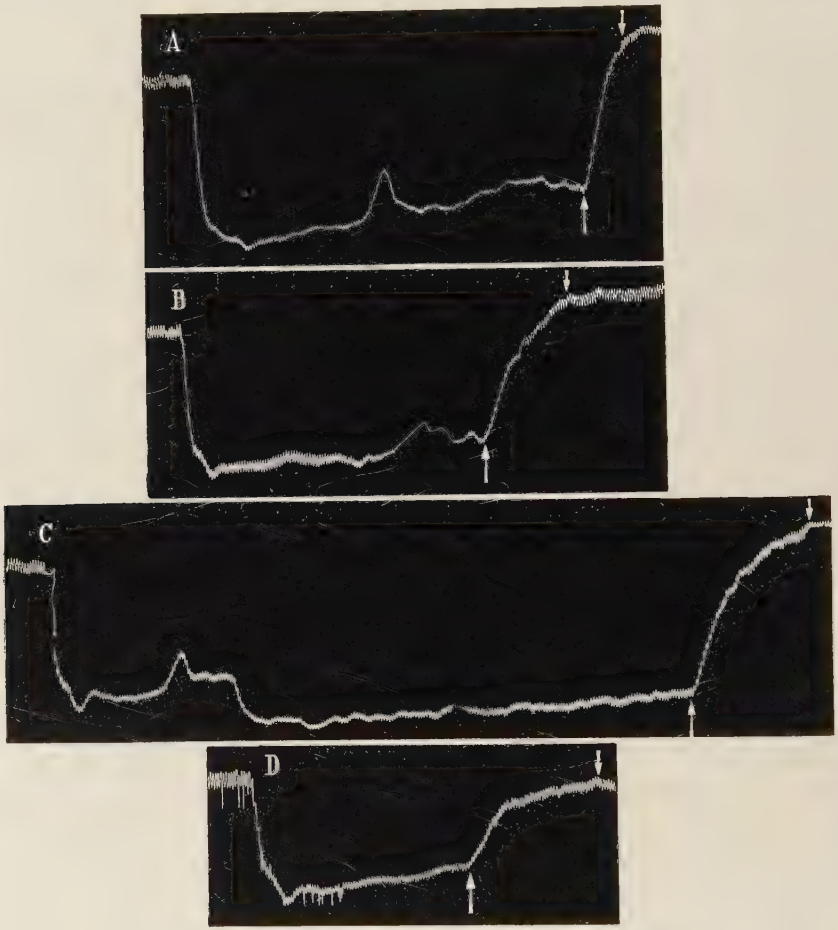


Abb. 6. 4 Azetylcholindauerinfusionen von 12,0 γ pro Minute.
A Ausgangsblutdruckhöhe 185 mm Hg, *B* Ausgangsblutdruckhöhe 115 mm Hg, *C* Ausgangsblutdruckhöhe 90 mm Hg, *D* Ausgangsblutdruckhöhe 75 mm Hg.

erwiesenen Einschränkung der Esterasewirkung im Blutserum kam es darauf an, im Gegensatz zu den graphischen Darstellungen am Verlauf von Blutdruckkurven, einen deutlich sichtbaren Beweis für die Veränderungen im Ablauf des Spaltungsprozesses von Azetylcholinchlorid bei verschiedener Blutdruckhöhe zu erbringen. Zu diesem Zwecke wurden die Nachwirkungs-

zeiten von Azetylcholindauerinfusionen beobachtet. Hierbei konnte die Tatsache festgestellt werden, daß mit sinkendem Blutdruck die Dauer der Nachwirkungszeit ständig zunimmt.

Abb. 6 zeigt die Wirkungen von 4 Azetylcholindauerinfusionen mit 12,0 γ pro Minute, die bei verschiedenen Blutdruckhöhen zwischen 185 und 75 mm Hg vorgenommen wurden. Bei *A* entsprach das Blutdruckniveau

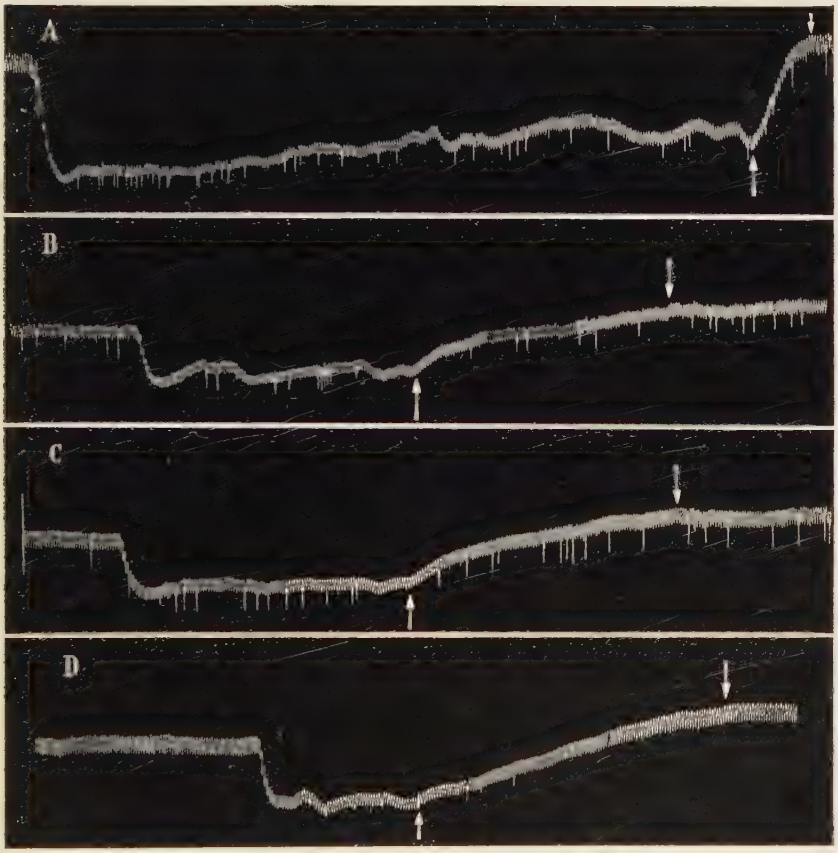


Abb. 7. 4 Dauerinfusionen mit 12,0 γ Azetylcholinchlorid pro Minute. *A* Ausgangsblutdruckhöhe 120 mm Hg, *B* Ausgangsblutdruckhöhe 55 mm Hg, *C* Ausgangsblutdruckhöhe 40 mm Hg, *D* Ausgangsblutdruckhöhe 30 mm Hg.

einer Höhe von 185 mm Hg, bei *B* von 115 mm Hg, bei *C* von 90 mm Hg und bei *D* von 75 mm Hg. Es ist deutlich zu erkennen, wie sich der Verlauf der Kurven beim Ausgleich der Dauerblutdrucksenkungen insofern ändert, als der durch Pfeile bezeichnete Teil der Kurve mit abnehmendem Blutdruck ständig größer wird.

In welch starkem Maße sich diese Verzögerung beim Esterabbau ausbilden kann, soll Abb. 7 zeigen. Die vier dargestellten Azetylcholindauer-

infusionen wurden wie bei Abb. 6 durch Gaben von 12,0 γ pro Minute erreicht. Die Dauerblutdrucksenkung von *A* wurde bei einer Ausgangsblutdruckhöhe von 120 mm Hg durchgeführt, bei *B* betrug das Ausgangsniveau 55 mm Hg, bei C 40 mm Hg und bei *D* 30 mm Hg. Auch in diesem Falle sieht man wiederum die Verlängerung der Dauer der Nachwirkungszeit mit sinkendem Blutdruck.

Abb. 8, die die Ergebnisse von neun verschiedenen Tierversuchen enthält, soll als Gesamtdarstellung die Beziehungen der Nachwirkungszeiten zur Blutdruckhöhe veranschaulichen. Auf der Abszisse ist die Nachwirkungszeit der Azetylcholindauerinfusion in Sekunden und auf der

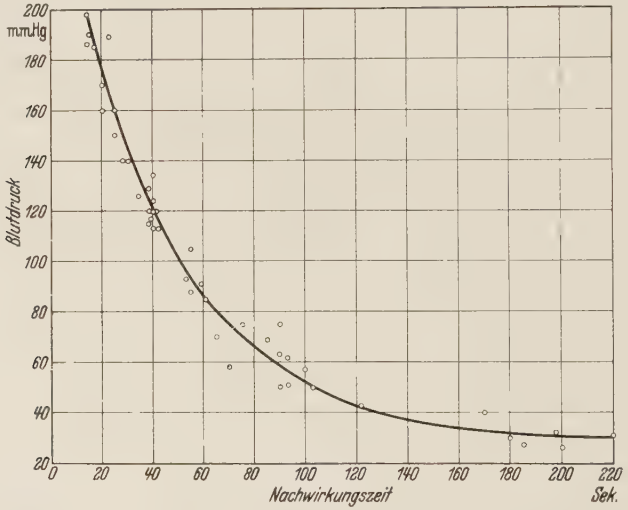


Abb. 8. Ordinate: Blutdruck in mm Hg. Abszisse: Nachwirkungszeit in Sekunden. Ergebnisse von 9 Versuchen.

Ordinate das Ausgangsniveau des Blutdrucks in mm Hg eingetragen. Der Verlauf der Kurve zeigt, daß die Nachwirkungszeiten bei Blutdruckunterschieden zwischen 200 und 30 mm Hg um fast das 16fache von 14 bis zu 220 Sekunden zunehmen können. Bei allen Azetylcholindauerinfusionen betrugen auch hier die zugeführten Mengen 12,0 γ pro Minute.

Auf Grund der Befunde, die die Abb. 6, 7 und 8 brachten, soll nun auf die Menge der freiwirksamen Esterase, die zum Abbau des Azetylcholins zur Verfügung steht, geschlossen werden. Beim Abstellen der Dauerinfusion kommt es zunächst solange zur Weiteraufrechterhaltung der Dauerblutdrucksenkung, bis das überschüssige Azetylcholinchlorid von der dem gesenkten Blutdruck entsprechenden wirksamen Esterasemenge abgebaut ist. Von überschüssigem Azetylcholin kann deshalb gesprochen werden, weil es bekannt ist, daß bereits Azetylcholindauerinfusionen von 5,0 bis zu 7,8 γ pro Minute bei jeder Blutdruckhöhe eine Dauerblutdruck-

senkung verursachen, während bei den zu besprechenden Versuchen für jede Dauerinfusion 12,0 γ pro Minute verwendet wurde. Aus diesem Grunde kam es nie sofort nach dem Abstellen der Dauerinfusion zum Abbau der bestehenden Dauerblutdrucksenkung, sondern je nach der Infusionsmenge und Eigenproduktionsmenge des Organismus wird die Dauerblutdrucksenkung noch längere Zeit von dem überschüssigen Azetylcholin, das die der Höhe des Blutdrucks entsprechende bestimmtwertige Esterasemenge als Differenz zwischen 5,0 bzw. 7,8 und 12,0 γ pro Minute übrig läßt, unterhalten. Es konnte bei allen Versuchen festgestellt werden, daß die Latenzzeit zwischen dem Abstellen der Dauerinfusion und dem Beginn des Ausgleichs der Dauerblutdrucksenkung mit der größeren Infusionsmenge deutlich zunimmt. Das gleiche konnte beim Absinken des Blutdruckniveaus beobachtet werden, wo ebenfalls diese Latenzzeit wegen der erhöhten

Abb. 9. a) Blutdrucksenkende Wirkung von 0,1 γ Azetylcholinchlorid bei einem Blutdruck von 90 mm Hg. b) Die Wirkung von 0,1 γ Azetylcholin während des Ausgleichs einer Azetylcholindauerinfusion von 12,0 γ pro Minute mit einer Dauerblutdrucksenkung von 35 mm Hg bei Durchlauf des gleichen Ausgangsblutdrucks von 90 mm Hg wie bei a).

Eigenproduktion des Organismus von Azetylcholin, wenn auch nur in geringem Maße, größer wird. Diese Befunde sind ein weiterer Beweis für die Konstanz, mit der eine bestimmte wirksame Esterasemenge an eine bestimmte Blutdruckhöhe gebunden ist.

Eingangs wurde gesagt, daß die Geschwindigkeit der Einstellung eines für jede Blutdruckhöhe bestimmten Gleichgewichts zwischen der gebildeten Menge Azetylcholin und der wirksamen Esterasemenge von der Fermenttätigkeit abhängig sei. In diesem Falle hier sieht man nun, wie die bei niederem Blutdruck mit starkem Vagustonus nur beschränkt zur Verfügung stehende freiwirksame Esterase die Dauerblutdrucksenkung im Organismus des Versuchstieres viel langsamer bis zur Ausgangshöhe des Blutdrucks beim Beginn der Dauerinfusion, die den oben erwähnten Gleichgewichtszustand bestimmt, ausgleicht, als bei hohem Blutdruck mit schwacher Vaguswirkung die gesteigerte Fermentmenge. Dabei ist es erstaunlich, wie die Einbuße der Esterasewirkung von nur einem Viertel bis zu einem Drittel bei den Warburg-Versuchen einer Zunahme der Nachwirkungszeit beim Ausgleich der Dauerblutdrucksenkung um das 16fache entspricht.

Daß es sich bei der Verzögerung im Ausgleich der Dauerblutdrucksenkung um einen verlangsamten Azetylcholinabbau handelt, soll Abb. 9 nachweisen. Unter a) ist die Wirkung von 0,1 γ Azetylcholinchlorid bei

einem Blutdruck von 90 mm Hg zu sehen. Der langsame Blutdruckanstieg unter b) demonstriert den Ausgleich einer Dauerblutdrucksenkung von 35 mm Hg bei dem gleichen Blutdruck von 90 mm Hg wie unter a). Die Dauerblutdrucksenkung wurde mit Gaben von 12,0 γ Azetylcholinchlorid pro Minute als Dauerinfusion erreicht. Die Senkungszacke während des Ausgleichs der Dauerblutdruckerniedrigung ist ebenfalls durch die Wirkung von 0,1 γ Azetylcholin verursacht. Beim Vergleich beider Wirkungen ist bei der Einzelinjektion von 0,1 γ Azetylcholin während des Ausgleichs der Dauerblutdrucksenkung eine deutliche Verlängerung der Wirkungsdauer gegenüber der Injektion vor der Azetylcholindauerinfusion zu erkennen. Dies weist auf einen verzögerten Esterabbau hin.

Einen weiteren Nachweis für die Richtigkeit der Annahme, daß mit sinkendem Blutdruck die Esterasekonzentration abnimmt, sieht man bei den Versuchen in den Abb. 6 und 7 an dem Verhalten der Wirkungsintensität der Azetylcholindauerblutdrucksenkung in Abhängigkeit von der Blutdruckhöhe. Wie schon früher festgestellt wurde[1], nimmt die Intensität sowohl der Azetylcholineinzelwirkung als auch der -dauerwirkung mit sinkendem Blutdruck ab. Im Sinne der jetzigen Versuche kann dieses Verhalten insofern verstanden werden, als die geringe Esterasekonzentration bei tiefem Blutdruck weniger Azetylcholin zum Verseifen bringen kann wie die gesteigerte bei hohem.

In einer früheren Arbeit haben Gremels und ich[6] die Nachwirkungszeit bei der Azetylcholindauerblutdrucksenkung von der Konzentration des Azetylcholins abhängig gemacht. Dies war jedoch eine Fehldeutung der experimentellen Tatsache, bei der die im Laufe der langen Versuchsdauer entstandene spontane Blutdrucksenkung rein zufällig gleichsinnig mit der Veränderung der Azetylcholinkonzentrationen bei den vorgenommenen Dauerinfusionen einherging. Unsere Arbeit wurde von Riechert und Musehold[7] nachgeprüft, die feststellten, daß die Nachwirkungszeiten bei Azetylcholindauerinfusionen unabhängig von der Konzentration seien. Zur Rechtfertigung des von uns in der damaligen Arbeit angegebenen Zusammenhanges von Nachwirkungszeit und Azetylcholinkonzentration sei darum erwähnt, daß mit den jetzigen Versuchen die Richtigkeit der experimentellen Tatsache gesichert und durch die bessere Kenntnis der Wirksamkeit der Esterase in Abhängigkeit von der Höhe des bestehenden Blutdrucks eine Erklärung gefunden zu sein scheint.

Abschließend sei noch erwähnt, daß auch die Dauer der Azetylcholininfusion ohne Einfluß auf die Nachwirkungszeit ist. Das zeigen die Kurven von Abb. 7 einwandfrei, denn die längste Dauerblutdrucksenkung hat die kürzeste Nachwirkungszeit und die kürzeste Dauerblutdrucksenkung die längste Nachwirkungszeit. Auch hier tritt das allein die Esterasekonzentration bestimmende Blutdruckniveau wiederum in den Vordergrund der Betrachtung.

[6] Gremels, H., u. F. Zinnitz: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **179**, 229 (1935). — [7] Riechert, W., u. W. Musehold: Ebenda **192**, 524 (1939).

Versuche an Spinalkatzen.

Die Versuche, die bisher an Tieren mit intaktem Nervensystem durchgeführt wurden, wurden in gleicher Weise an Daleschen Spinalkatzen wiederholt. Mit dem Wegfall jeglichen zerebralen Einflusses blieben auch die Unterschiede in den Esterasekonzentrationen im Blutserum in Abhängigkeit von der Höhe des Blutdrucks, wie sie an Normalkatzen beobachtet werden konnten, aus. Manchmal ergab sich in der ersten Versuchsstunde während der Blutdruckabnahme eine geringe Herabsetzung der Esterasekonzentration im Sinne der Versuche an Normaltieren, die mit der Restfunktion des Gehirnstumpfes in Verbindung gebracht wurden. Hatte sich aber bei dem Spinaltier ein gleichmäßig niederer Blutdruck eingestellt, dann blieben jegliche Unterschiede, die auf eine Änderung der Esterasekonzentration im Blutserum schließen ließen, weg. Auch wenn der Blutdruck durch Adrenalindauerinfusion gesteigert wurde, blieb die Fermentkonzentration im Blutserum stets gleich. Dasselbe gilt für die Nachwirkungszeiten bei den Azetylcholindauerblutdrucksenkungen, die bei hohem und niederem Blutdruck gleich lang waren. Nur während der ersten Versuchsstunde beim langsamen Absinken des Blutdrucks kam es noch zu Unterschieden wie bei Normaltieren. Über die Wirkung der elektrischen Vagusreizung an Spinalkatzen in bezug auf die Fermentkonzentration soll demnächst in anderem Zusammenhange berichtet werden. Hierbei ließ sich eine teilweise Einschränkung feststellen.

Die Steuerung des Potentialwirkungsmechanismus des Azetylcholins durch die Esterase.

Aus früheren Versuchen[1] ist bekannt, daß sich beim Normaltier die Azetylcholinkonzentration am Wirkungsort der Gefäßnervenendzellen mit der Höhe des Blutdrucks ändert. Die jetzigen Versuche zeigen, daß auch die Esterasekonzentration in Abhängigkeit von der Blutdruckhöhe unterschiedlich ist. Und zwar in dem Sinne, daß mit zunehmender Azetylcholinkonzentration die Esterasekonzentration abnimmt. Für jede Blutdruckhöhe besteht danach, wie schon oben beschrieben wurde, ein dynamisches Gleichgewicht, das von den beiden Reaktionspartnern Azetylcholin und Ferment mit einem bestimmten Mengenverhältnis gehalten wird. Der Ausfall der cerebralen Funktionen beim Spinaltier geht mit dem Verlust der Unterschiede in den Azetylcholin-[1] und Esterasekonzentrationen einher. Daraus kann geschlossen werden, daß unter dem Einfluß cerebraler Impulse die Azetylcholin- und Esterasekonzentration im Organismus gesteuert wird. Nach den bisherigen Annahmen werden durch diese Impulse die cholinergischen Nervenendzellen in Erregung gesetzt, und es kommt zu einer Steigerung der Azetylcholinkonzentration am Wirkungsort. Auf Grund der in dieser Arbeit angestellten Versuche kann angenommen werden, daß bei einem niedrigen Blutdruck mit starker Vaguswirkung und

hoher Azetylcholinkonzentration ständig eine hohe Esterasekonzentration zum Wirkungsabbau benötigt wird. Dadurch wird die freiwirksame Esterasemenge eingeschränkt. Andererseits nimmt die Esterasekonzentration im Blutserum bei hohem Blutdruck zu, da zum Abbau des niedrigen Azetylcholinkonzentrationspotentials nur eine geringe Esterasemenge erforderlich ist. So besteht für jede Blutdruckhöhe ein Esterase- und Azetylcholinkonzentrationsoptimum, die sich beide bei den stattfindenden Gleichgewichtsreaktionen ergänzen. Bei der Beobachtung der einzelnen Phasen im Verlauf der Azetylcholineinzel- und -dauerwirkung bekommt man ein deutliches Bild von den Abhängigkeiten beider Reaktionspartner untereinander. So hat bei einem hohen Blutdruck mit niedrigem Azetylcholinkonzentrationspotential und erhöhter freiwirksamer Esterasekonzentration die Azetylcholinwirkung immer eine kurze Latenzzeit, hohe Intensität und geringe Dauer, während sie bei einem niedrigen Blutdruck mit hohem Azetylcholinkonzentrationspotential und herabgesetzter freiwirksamer Esterasekonzentration eine längere Latenzzeit, geringere Intensität und längere Dauer hat.

Wie die Versuche zeigen, wurde durch elektrische Reizung des Vagus die stärkste Einschränkung der Fermentwirkung erreicht. Bei der wohl anzunehmenden geringen Intensität cerebraler Impulse im Vergleich zu dieser Reizung können auch die geringen Differenzen in den Esterasekonzentrationen bei großen Unterschieden in den Blutdruckhöhen verstanden werden. Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Versuche kann angenommen werden, daß unter der Steuerung cerebraler Impulse die Esterasekonzentration in dem Sinne beeinflußt wird, daß sie mit zunehmender Intensität der Reizung abnimmt. Als weitere Folgerung aus diesem Befunde kann man den Schluß ziehen, daß unter cerebralen Einflüssen nicht allein die andauernde Unterhaltung eines bestimmten Azetylcholinkonzentrationspotentials besteht, sondern auch die Änderung der koordinierten Esterasekonzentration mit wechselnder Blutdruckhöhe gesteuert wird. Als Erklärung für dieses Verhalten erscheint am wahrscheinlichsten, daß als Folge der mit sinkendem Blutdruck an Intensität zunehmenden zentralen Vaguswirkung eine Permeabilitätsveränderung der Zellgrenzflächen am Wirkungsort der cholinergischen Nervenendzellen zustande kommt. Es scheinen mehrere Faktoren zu sein, die bei diesem Vorgang einer Änderung in ihrer Wirksamkeit unterliegen. Mit sinkendem Blutdruck kommt es zu einer erhöhten Dauerbildung von Azetylcholin am Wirkungsort, die eine Steigerung des Azetylcholinkonzentrationspotentials zur Folge hat. Weiterhin wird gleichzeitig zur Erhaltung des starken Vagusreizes bei niedrigem Blutdruck die Permeabilität vermindert und so die Membran gegen den Ausgleich des wirksamen Azetylcholinkonzentrationspotentials abgedichtet sein, was die langen Nachwirkungszeiten bei den Azetylcholindauerinfusionen zur Genüge zeigen. Im gleichen Sinne kommt es durch die Einwirkung auf die Zelloberflächen zu einer direkten Einschränkung

der Esterasewirkung, die den Aufbau des erhöhten Azetylcholinkonzentrationspotentials mit abnehmender Blutdruckhöhe erleichtert. Und außerdem gibt die durch die verminderte Permeabilität und herabgesetzte Esterasekonzentration verlangsamte Verseifungsgeschwindigkeit das gebundene spaltende Ferment in geringerem Grade zu erneuter Wirkung frei. Es ergibt sich so eine sinnvolle Verteilung der Rollen für die Reaktionsteilnehmer Azetylcholin und Ferment, die einen ökonomischen Ablauf der Zustandsänderungen bei der Bildung des Vagusreizes garantieren und gleichzeitig diesen für den Organismus so wichtigen Vorgang in seinem Ablaufe mehrfach sichern helfen. Daß mit der zunehmenden Stärke eines Reizes das Erfolgsorgan unempfindlicher gegen diesen wird, ist bekannt, daß es dies nach der Deutung der hier vorliegenden Versuche sein muß, spricht nur für die Richtigkeit der gemachten Annahme. Der ökonomische Aufbau eines hohen Azetylcholinkonzentrationspotentials am Wirkungsort der cholinergischen Gefäßnervenendzellen verlangt bei der Dauerbildung die Eindämmung der Fermentwirkung. Denn eine starke Esterasewirkung würde bei niederem Blutdruck nur immer neue Azetylcholinmengen unnütz vergeuden, statt durch die Einschränkung der Esterasewirkung und Herabsetzung der Verseifungsgeschwindigkeit bei gleichzeitig erschwertem Ausgleich des wirksamen Azetylcholinkonzentrationspotentials auf Grund der verminderten Permeabilität jeden Anreiz zu erneuter Azetylcholinbildung zu verhindern.

Es ist interessant festzustellen, daß dem verlangsamten Abbau des Azetylcholins mit sinkendem Blutdruck ein immer gleichmäßig schneller Aufbau gegenübersteht. Das konnte bereits in früheren Versuchen[1] festgestellt werden und die Abb. 6 und 7 lassen es ebenfalls erkennen. Daß die mit zunehmender Vaguswirkung wachsende Permeabilitätsverminderung nur den Ausgleich des bestehenden Azetylcholinkonzentrationspotentials vom Wirkungsort her in der Richtung zum umgebenden Gewebe hemmen soll, scheint im Sinne der jetzigen Versuche nicht leicht erklärlich. Es wäre vielmehr berechtigt anzunehmen, daß Bildungs- und Wirkungsort des Azetylcholins dasselbe sind.

Die hier angestellten Versuche sollen weiterhin zeigen, daß der Potentialwirkungsmechanismus des Azetylcholins im Sinne von Straubs Potentialtheorie bei seiner Wirkung auf den Blutdruck durch die Esterase ergänzt und bei der Schaffung der einzelnen Potentialbedingungen durch diese gesteuert wird. Dadurch erweist sich die Potentialtheorie als mitbestimmend für die Bildung des regulatorischen Vorgangs, den das cholinergische Gefäßnervensystem im Funktionssystem des Kreislaufgeschehens darstellt.

Zusammenfassung.

1. Es wurde die Cholinesterasekonzentration im Blutserum von Katzen in Abhängigkeit von der Höhe des Blutdrucks bestimmt. Dabei ergab sich, daß mit sinkendem Blutdruck der Esterasegehalt des Blutserums abnimmt.

2. Durch elektrische Vagusreizung wird die Esterasekonzentration im Blutserum vermindert. Sie nimmt mit zunehmender Reizstärke mehr und mehr ab.

3. Die Nachwirkungszeiten von Azetylcholindauerinfusionen sind von der Höhe des Ausgangsblutdrucks abhängig. Mit abnehmender Blutdruckhöhe werden sie verlängert.

4. Bei Spinalkatzen fallen nach dem Ausbleiben der cerebralen Restfunktionen Unterschiede der Esterasekonzentration in Abhängigkeit von der Höhe des Blutdrucks weg.

5. Durch elektrische Vagusreizung tritt auch bei Spinalkatzen eine Einschränkung der Fermentwirkung auf.

6. Die Nachwirkungszeiten von Azetylcholindauerinfusionen sind bei Spinalkatzen nach dem Wegfall der cerebralen Restfunktionen in Abhängigkeit von der Höhe des Blutdrucks nicht unterschiedlich.

7. Die Steuerung des Potentialwirkungsmechanismus des Azetylcholins im Sinne von Straubs Potentialtheorie bei der Wirkung auf den Blutdruck durch die Esterase wird besprochen.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Anhang.

Rührvorrichtung für Wasserbäder nach Heuwing[4].

Zur kräftigen Durchrührung des bei den beschriebenen Versuchen verwendeten 300 Liter Flüssigkeit fassenden Wasserbades wurde eine von Heuwing konstruierte Rührvorrichtung benutzt. Der Aufriß in Abb. 10 zeigt, daß auf einem Dreifuß *A* ein weites Rohr *B* geschraubt ist, das an seinem oberen Ende einen kleinen Elektromotor *C* ($^1/_{80}$ PS) trägt, dessen Umdrehungszahl über einen Regulierwiderstand nach Bedarf geändert werden kann. Die Achse des Motors ist nach unten verlängert und trägt an ihrem Ende einen dreiflügeligen Propeller. Der Propeller saugt das Wasser durch die 6 Löcher *D* an und drückt es am unteren Ende des Rohres *B* durch die leicht abwärts gerichteten 6 Rohrstutzen *E* wieder hinaus. Die Löcher *D* sind im Gesamtquerschnitt etwa $^1/_4$mal größer gehalten als die Stutzen *E*, was einen zu starken Sog oberhalb des Propellers verhindern soll. Einige im Innern des Rohres *B* senkrecht angebrachte Bleche vermeiden, daß das Wasser in eine quirlende Bewegung kommt. Ein Vorteil der Anordnung besteht darin, daß sich unter Wasser kein Achsenlager befindet, dessen Schmierung stets Schwierigkeiten bereiten würde. Ein weiterer Vorzug, den diese Rührvorrichtung vor anderen Rührwerken hat, ist der, daß sie fast lautlos arbeitet.

Glasapparat zur Dauerinfusion.

Zur Dauerinfusion von Azetylcholinchlorid wurde bei den beschriebenen Versuchen eine Glasapparatur verwendet, die es gestattete, mit Hilfe eines Quecksilberstromes, der durch ein Hahnsystem reguliert wird, geringe Flüssigkeitsmengen von 1.5 ccm pro Stunde an in die Vena jugularis des Versuchstieres einfließen zu lassen.

Abb. 11 zeigt eine schematische Auf-

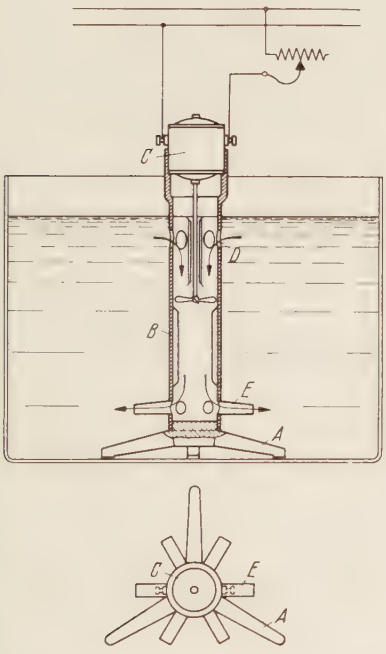


Abb. 10. Rührvorrichtung für Wasserbäder nach Heuwing.

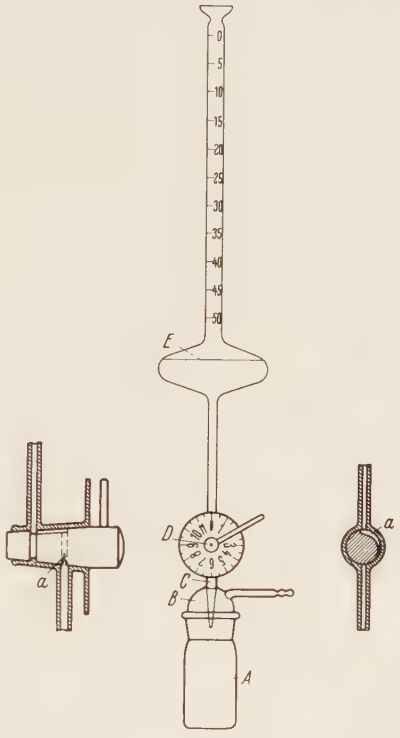


Abb. 11. Glasapparat zur Dauerinfusion.

zeichnung der Apparatur. Das Gefäß *A* enthält die zu infundierende Flüssigkeit. In den hohlen Glasstopfen *B* ist eine Kapillare *C* sowie ein Schlauchansatz eingeschmolzen, durch den die Flüssigkeit entweichen kann. Die Kapillare trägt an ihrem oberen Ende den Hahn *D*. Das Gefäß *E* dient zur Aufnahme des Quecksilbers. Es hat eine große Oberfläche, damit auch bei langdauernder Infusion ein möglichst kleiner Niveauunterschied entsteht. An das Gefäß *E* ist eine normale 50-ccm-Bürette angeschmolzen. Sie wird mit Wasser oder Benzol gefüllt. An der Skala kann die infundierte Menge bequem abgelesen werden. Das linke Bild der Abb. 11 stellt den Hahn im Längsschnitt dar. Zu- und Abfluß sind

gegeneinander versetzt. Zweckmäßig angeordnete Kanäle lassen das Quecksilber in die feine Rinne *a* treten. Die Rinne *a* verläuft genau symmetrisch. Der Verlauf der Rinne ist in dem rechten Bilde der Abb. 11 im Querschnitt vergrößert dargestellt. Die Stellung der Rinne *a* ist an der ringförmigen Teilung abzulesen. Die Dauerinfusionen mit dieser Apparatur konnten auch mit nur geringen Flüssigkeitsmengen von 2—4 ccm pro Stunde reibungslos 8 Stunden lang durchgeführt werden. Dabei senkte sich der Quecksilberspiegel im Gefäß *E* kaum merklich. Daß der Azetylcholinzustrom auch während langdauernder Infusionen keinen nennenswerten Schwankungen unterlag, konnte an der immer gleichmäßig tief bleibenden Dauerblutdrucksenkung erkannt werden. Diese Apparatur wurde in Zusammenarbeit mit Heuwing[4], dem vor allem die Durchführung des Hahnsystems oblag, hergestellt.

Aus dem Instituto Biologico in São Paulo, Brasilien.

Beiträge zur Pharmakologie des Trypsins.

I. Wirkung des Trypsins auf die glatten Muskeln des Dünndarms und die Gebärmutter von Säugetieren. Die Freisetzung von Histamin nach Durchströmung der Meerschweinchenlunge mit Trypsin.

Von

M. Rocha e Silva.

Mit 15 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. August 1939.)

Die Versuche, über die nachstehend berichtet werden soll, bezweckten, die Wirkung des Trypsins auf die isolierten Säugetierorgane, insbesondere auf den Dünndarm und die Gebärmutter verschiedener Tierarten und die isolierte Meerschweinchenlunge aufzuklären. Diese Versuchsergebnisse sollen einen Beitrag zu den Kenntnissen über die Pharmakologie des Trypsins liefern. Die Einzelheiten sind bisher nur kurz in einigen früheren Veröffentlichungen von uns mitgeteilt worden [1, 2, 3, 4].

Es ist auffallend, daß eine biologisch so wichtige Substanz wie das Trypsin bis jetzt niemals pharmakologisch untersucht wurde, obzwar es allgemein bekannt ist, daß es unter Umständen auf die lebenden Gewebe schädlich wirkt.

Andererseits ist die Bedeutung der Untersuchung von Organextrakten nicht nur unter pharmakologischem und therapeutischem Gesichtspunkt anerkannt. Gerade auf den Studien der von solchen Organextrakten ausgelösten Reaktion basiert die Physiologie der chemischen Vermittlungsprozesse bei Nervenerregung und fast die gesamte Endokrinologie. Die Feststellung der pharmakologischen Eigenschaften einer Substanz, welche in bedeutender Menge und in einer leicht aktivierbaren Form (Trypsinogen) in dem Pankreas vorkommt, würde uns das Verstehen der zahlreichen Wirkungen, welche den Extrakten dieser Drüse zugeschrieben werden, wesentlich erleichtern.

Die Kenntnis der pharmakologischen Eigenschaften eines proteolytischen Ferments, das bei dem physiologischen p_H der lebenden Gewebe aktiv ist, würde uns außerdem die Möglichkeit geben, die bisher ziemlich mangelhaft und unsicher bekannten pharmakologischen Wirkungen gewisser Schlangengifte und Mikrobentoxine näher kennenzulernen. Die von

[1] Rocha e Silva, M.: Arqu. Inst. Biol. **9**, 145 (1938). — [2] Rocha e Silva, M.: C. r. Soc. Biol. **130**, 181 (1939). — [3] Rocha e Silva, M.: Ebenda, S. 184. — [4] Rocha e Silva, M.: Ebenda, S. 186.

Trypsin verursachten und von uns früher beschriebenen pharmakologischen Wirkungen sind in der Tat sehr ähnlich den von verschiedenen Autoren in bezug auf Schlangengifte (Kellaway[5], Essex und Markowitz[6], Tetsch und Wolff[7], Gautrelet und Mitarbeiter[8,9], Feldberg und Kellaway[10,11,12], Richter[13] und viele andere), auf Bienengift (Tetsch und Wolff[7], Feldberg und Kellaway[14], Richter[13]) und auf Bakterientoxine (Kellaway[5], Feldberg und Kellaway[15]) festgestellten. Das Vorhandensein von wirksamen Stoffen mit proteolytischer Eigenschaft in vielen dieser Gifte und Toxine ist eine, von zahlreichen Forschern festgestellte Tatsache (bezüglich der Schlangengifte s. Kellaway[16] und Gessner[17], bezüglich der Bakterientoxine s. Maschmann[18]).

Gewiß haben Feldberg und Kellaway[19], sowie Feldberg, Holden und Kellaway[20] in ihren letzten Veröffentlichungen nur gewisse Beziehungen und keine vollkommene Übereinstimmung zwischen der pharmakologischen Wirkung von Schlangengiften und ihrer Fähigkeit, in Anwesenheit von Gewebelipoiden lysocithinartige Substanzen zu bilden, aufgestellt. Jedoch besteht eine derartige Ähnlichkeit zwischen der Trypsinwirkung und der Wirkung solcher Schlangengifte, daß bei diesen die beobachteten pharmakologischen Eigenschaften am besten als Ausdruck eines Zusammenwirkens ihrer proteolytischen Fähigkeit mit gewissen Substanzen von unbekannter Natur zu verstehen sind.

Methodik.

Die Mehrzahl der hier beschriebenen Versuche wurde mittels eines kristallinischen Präparats durchgeführt[21].

Die bei der Durchströmung der glatten Muskeln verwendete Tyrodelösung entsprach, bis auf das Magnesiumsalz, der gewöhnlichen Lösung dieser Bezeichnung. In Vorversuchen konnten wir feststellen, daß die Verwendung von $MgSO_4$ statt des üblichen $MgCl_2$ für die Reizbarkeit und

[5] Kellaway, C. H.: Brit. J. exper. Path. **10**, 281 (1929). — [6] Essex, H. E., u. J. T. Markowitz: Amer. J. Physiol. **92**, 317 (1930). — [7] Tetsch, C., u. K. Wolff: Biochem. Z. **288**, 126 (1936). — [8] Gautrelet, J., u. N. Halpern: C. r. Soc. Biol. **115**, 942 (1934). — [9] Gautrelet, J., N. Halpern u. E. Carteggiani: Ebenda **116**, 867 (1934). — [10] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: J. Physiol. (Brit.) **90**, 257 (1937). — [11] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: Austral. J. exper. Biol. a. med. Sci. **15**, 81 (1937). — [12] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: Ebenda, S. 159. — [13] Richter, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 172 (1938). — [14] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: Austral. J. exper. Biol. a. med. Sci. **15**, 461 (1937). — [15] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: Ebenda **16**, 249 (1938). — [16] Kellaway, C. H.: Bull. of the Johns Hopkins Hosp. **60**, 18 (1937). — [17] Gessner, O.: Tierische Gifte (in Handb. exper. Pharmak., 6. Ergänz.-Band). Berlin, Jul. Springer, 1938. — [18] Maschmann, E.: Biochem. Z. **300**, 89 (1939). — [19] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: J. Physiol. (Brit.) **94**, 187 (1938). — [20] Feldberg, W., H. F. Holden u. C. H. Kellaway: Ebenda, S. 232. — [21] Dasselbe wurde nach der Methode von M. Kunitz u. J. Northrop [J. gen. Physiol. (Am.) **19**, 991 (1935)] hergestellt und von Herrn Prof. J. Northrop liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt.

Vitalität der Muskeln keine Nachteile bedeutet. Die Durchströmungsflüssigkeit enthielt 0,025 % wasserfreies $MgSO_4$.

Das kristallinische Trypsin enthielt die gleiche Gewichtsmenge wasserfreies $MgSO_4$, weshalb die Testlösung auf die Weise hergestellt wurde, daß 50 mg des Ferments (also 25 mg kristallinisches Trypsin und 25 mg wasserfreies $MgSO_4$) in 100 ccm Mg-freier Tyrode gelöst wurden. Nach der Auflösung des Trypsins hatten wir also eine trypsinhaltige Tyrodelösung, deren $MgSO_4$-Gehalt dem der Perfusionsflüssigkeit gleich war.

Um die Reizbarkeit der glatten Muskeln festzustellen, benutzten wir gewöhnlich das Histamin-Dichlorhydrat (Schuchardt). In den Versuchen mit Kaninchenuterus verwendeten wir Adrenalinlösungen, welche aus einer Parke-Davisschen $^1/_{1000}$ Stammlösung hergestellt wurden.

Das — in einigen Versuchen verwendete — gewöhnliche Trypsin wurde erst nach einer vorausgehenden Dialyse verwendet (24 Std. gegen fließendes Wasser, 6 Tage gegen dest. H_2O im Eisschrank). Die auf diese Weise gereinigte Lösung zeigte sich frei von den gewöhnlichen wirksamen Stoffen (Histamin, Azetylcholin, Adenosin, K-Salzen usw.).

Die Durchströmung der Lunge wurde nach der Methode von Feldberg u. Mitarb.[22] mittels einer in die Art. Pulm. eingeführten Kanüle vorgenommen. Die von dem Tier getrennte Lunge befand sich auf einer aus Celluloid angefertigten geeigneten Mulde. Die Perfusionsflüssigkeit wurde mit Hilfe einer gleichfalls aus Celluloid angefertigten Rinne in graduierte Gefäße geleitet. Die Histaminbestimmung wurde nach dem von Code[23] für den Meerschweinchen-Ileus ausgearbeiteten und von uns modifizierten[24] Verfahren durchgeführt.

Versuchsergebnisse.

I. Wirkung auf die glatten Säugetiermuskeln.

a) Wirkung auf den isolierten Dünndarm. Das Trypsin hat auf sämtliche von uns untersuchten glatten Muskeln eine tonuserhöhende Wirkung ausgeübt; eine Ausnahme bildete nur der Dünndarm der weißen Maus, welcher sich, selbst hohen Fermentdosen gegenüber, vollkommen refraktär zeigte.

Die charakteristische Trypsinwirkung auf den isolierten Säugetierdünndarm läßt sich folgenderweise beschreiben: Das Hinzufügen von Trypsinlösung zu der Flüssigkeit, in dem sich das Darmstück befindet, löst eine langsame Erhöhung des Tonus aus. Diese Erhöhung erwies sich wiederholten Waschungen mit Tyrodelösung gegenüber als sehr resistent. Der langsamen Tonuserhöhung geht gewöhnlich eine Latenzzeit voraus, welche zwischen einigen Sekunden und 1—2 Minuten variiert. Häufig beobachtet

[22] Bartosch, R., W. Feldberg u. E. Nagel: Pflügers Arch. **230**, 674 (1932). — [23] Code, C. F.: J. Physiol. (Brit.) **89**, 257 (1937). — [24] Rocha e Silva, M.: Im Druck.

man vereinzelte und sporadische Kontraktionen, die sich der beschriebenen Tonuserhöhung superponieren. Nach wiederholten Erneuerungen der Tyrodewaschflüssigkeit (auf den Kurven stets: ↓) kehrt der Muskel rascher oder langsamer zu seinem gewöhnlichen Tonus zurück.

Abb. 1 zeigt uns die Wirkung, welche durch Hinzufügen von 0,5 mg kristallinischem Trypsin zu 30 ccm Tyrodelösung, in die ein Meerschweinchendünndarmstück eintauchte, ausgelöst wurde.

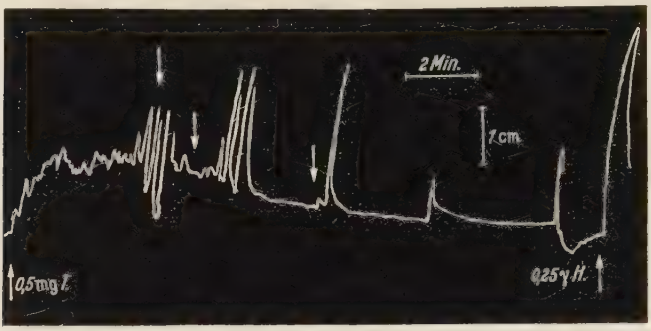


Abb. 1. Meerschweinchendünndarm. Wirkung von 0,5 mg krist. Trypsin (*T*) in 30 ccm Tyrodelösung. *H* = Histamindichlorhydrat.

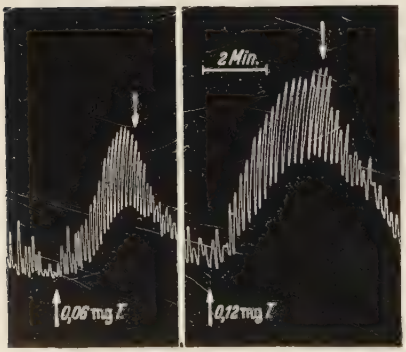


Abb. 2. Katzendünndarm. Tonuserhöhende und Reizwirkung auf die spontane Kontraktion, hervorgerufen durch krist. Trypsin.

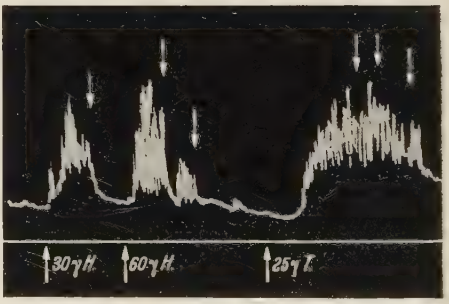


Abb. 3. Rattendünndarm. Wirkung von 25 γ krist. Trypsin sowie 30 γ und 60 γ Histaminsalz.

Abb. 2 zeigt uns eine ähnliche Wirkung auf ein Dünndarmstück der Katze, wobei zu der Tyrodelösung krist. Trypsin (0,12 und 0,06 mg) hinzugefügt wurde. Man sieht die rapide Steigerung des Darmtonus und die deutliche Zunahme der Amplitude der Spontankontraktionen.

Die Fähigkeit des Trypsins, die Amplitude der Spontankontraktionen zu erhöhen, ist ferner in Abb. 3 ersichtlich, welche einen am Rattendünndarm durchgeführten Versuch wiedergibt.

Die gleiche Wirkung zeigt uns der durch Abb. 4 wiedergegebene Versuch, dessen Testobjekt ein Stück Kaninchendünndarm war. Nachdem zu der (30 ccm) Tyrodelösung zweimal je 0,5 mg krist. Trypsin hinzugefügt wurde, zeigte sich nach einer Latenzzeit von einigen Sekunden eine rasche Kontraktion. Man sieht, daß die Kontraktionen schon nach der ersten

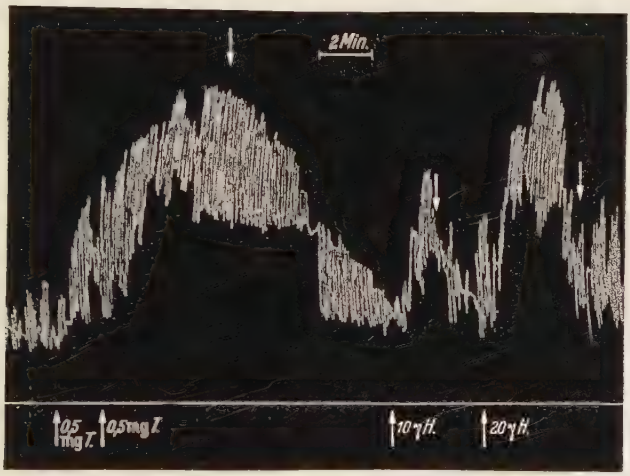


Abb. 4. Kaninchendünndarm. T = krist. Trypsin, H = Histamindichlorhydrat.

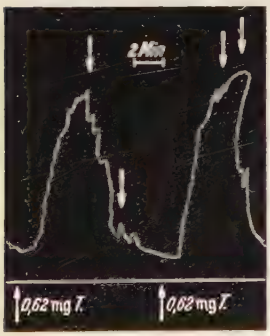


Abb. 5. Gebärmutter von jungfräulichem Meerschweinchen. Wirkung von zweimaligen, je 0,62 mg entsprechenden Trypsingaben.

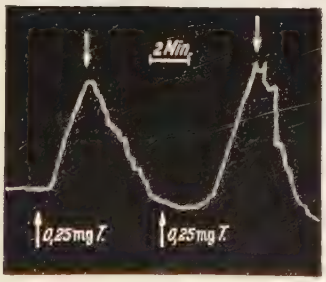


Abb. 6. Kaninchenuterus im Dioestrus. Wirkung von zwei Trypsingaben von je 0,25 mg.

Fermentportion an Stärke zugenommen haben. Ähnliche Wirkung lösten 10 bzw. 20 γ Histamin aus.

Die gleiche tonussteigernde Wirkung konnte am Hundedarm beobachtet werden.

b) Wirkung auf den isolierten Uterus. Die Versuche wurden an jungfräulicher Meerschweinchen- bzw. Rattengebärmutter oder an Ka-

ninchengebärmutter im Dioestrus durchgeführt. Hauptsächlich der jungfräuliche Meerschweinchenuterus erwies sich als äußerst empfindlich, indem er bereits auf minimale Fermentdosen deutlich reagierte. Der Kaninchenuterus hat sich des öfteren sogar gegenüber längere Zeit hindurch (30 Min.) währender Trypsineinwirkung als refraktär erwiesen.

Abb. 5 zeigt die Wirkung des Trypsins auf den jungfräulichen Meerschweinchenuterus. Man kann zwei durch zweimaliges Hinzufügen von je 0,62 mg krist. Trypsin ausgelöste Kontraktionen sehen. Auch die leichte Verlängerung der Latenzzeit ist klar erkennbar.

Abb. 6 zeigt uns die tonussteigernde Wirkung von zwei nacheinander verabreichten Dosen von je 0,25 mg Trypsin. In der Tyrodelösung befand sich ein Gebärmutterstück vom Kaninchen außerhalb der Brunstzeit. Vor der zweiten Kontraktion ist die im Verhältnis zu der ersten Kontraktion

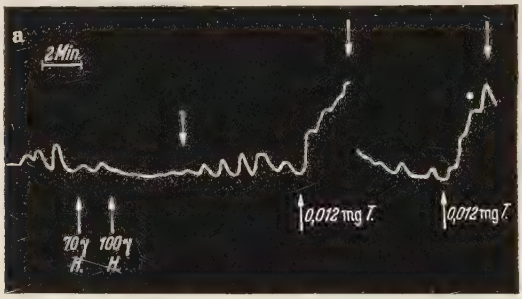


Abb. 7. Gebärmutter jungfräulicher Ratte. Tonussteigernde Wirkung des Trypsins (krist.).

deutlich verlängerte Latenzzeit sichtbar. Diese Verlängerung der Latenzzeit ist eine Erscheinung von allgemeinem Charakter. Wir werden uns mit ihr weiterhin unter dem Namen „Trypsindesensibilisierung" befassen.

Abb. 7 zeigt uns die tonussteigernde Wirkung des Trypsins auf die jungfräuliche Gebärmutter der Ratte.

c) Wirkung der Atropinbehandlung. Wir haben feststellen können, daß das Hinzufügen von Atropin zu der die Dünndarmstücke enthaltenden Nährflüssigkeit die von dem Trypsin ausgelöste Kontraktion unbeeinflußt läßt.

Abb. 8 zeigt uns, daß das Hinzufügen von 0,6 mg Atropin zu 30 ccm Tyrodelösung die von 0,12 mg krist. Trypsin ausgelöste Kontraktion ebenso vollkommen unbeeinflußt gelassen hat, wie 0,4 mg Atropin eine von 30 γ Histamindichlorhydrat hervorgerufene Kontraktion nicht änderte.

Die gleiche Wirkung wurde auch am jungfräulichen Rattenuterus beobachtet. Das Hinzufügen von 1 mg Atropin zu der Tyrodelösung hat die von 0,25 mg krist. Trypsin bedingte Kontraktion nicht im geringsten beeinflußt.

d) Desensibilisierung gegenüber kleinen Trypsingaben. Wir haben in früheren Veröffentlichungen [1, 2, 4] auf die ständige Erscheinung von allgemeinem Charakter hingewiesen, die wir als Desensibilisierung gegenüber dem Trypsin bezeichneten. Kleine wiederholt zu der Nährlösung gegebene Fermentdosen rufen eine Abnahme der Muskelreizbarkeit hervor, welche sich einerseits in der Verlängerung der Latenzzeit, anderseits in der Abnahme der Reaktionsintensität äußert. Diese Erscheinung konnten wir — mehr oder minder scharf — an allen bisher untersuchten glatten Muskeln feststellen. Besonders der Kaninchendünndarm zeigt diese Erscheinung auf eine sehr ausgeprägte Weise, selbst bei Verwendung von größeren Fermentdosen. Der Dünndarm und der Uterus des

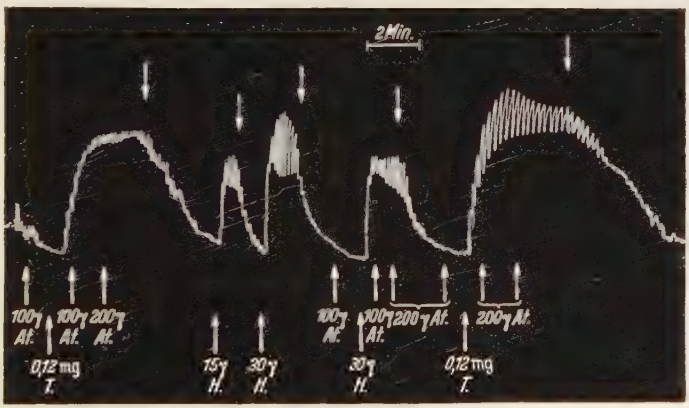


Abb. 8. Katzendünndarm. Kein Einfluß von Atropin (*At* = Atropin, *H* = Histamindichlorhydrat).

Meerschweinchens erwiesen sich dagegen nur sehr kleinen Fermentdosen gegenüber desensibilisiert. Die größere oder geringere Leichtigkeit, mit der ein Muskel desensibilisiert wird, scheint uns ein Maß seiner Trypsinempfindlichkeit zu sein.

Abb. 9 zeigt die Reaktion und Desensibilisierung eines Meerschweinchenuterus gegenüber steigenden Dosen von krist. Trypsin. Nach der ersten durch 1 γ Trypsin ausgelösten und nach einer Latenzzeit von 40 Sek. erfolgten Kontraktion war der Muskel für die gleiche Dosis unempfindlich. Um eine zweite Kontraktion auszulösen, waren 60 γ krist. Trypsin notwendig. Die dritte Kontraktion erfolgte erst, nachdem der Nährlösung 210 γ Trypsin hinzugefügt wurden, wonach die Desensibilisierung auch gegenüber dieser Dosis folgte. Um eine vierte Kontraktion auszulösen, waren 625 γ des Trypsins notwendig, und eine fünfte war erst durch Hinzufügen von 1 mg Trypsin zu erreichen.

Mit größeren Dosen läßt sich nur eine relative Desensibilisierung erreichen. Abb. 10 zeigt uns eine solche. Nach Einwirkung von starken Dosen (0,52 mg) erfolgte die Muskelkontraktion von neuem schon nach

einer geringeren Gabe (0,25 mg), der gegenüber sich der Muskel vorher desensibilisiert gezeigt hatte.

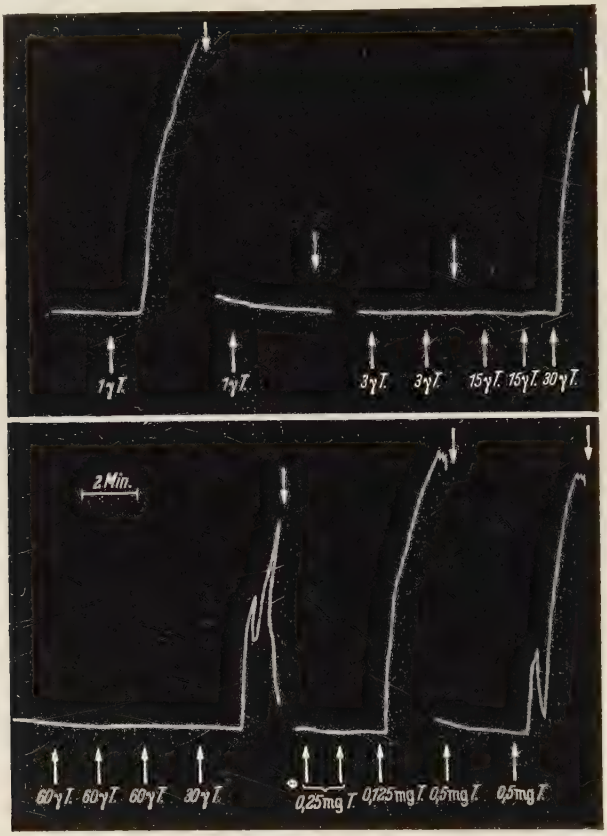


Abb. 9. Meerschweinchenuterus. Desensibilisierung gegenüber progressiv zunehmenden Dosen.

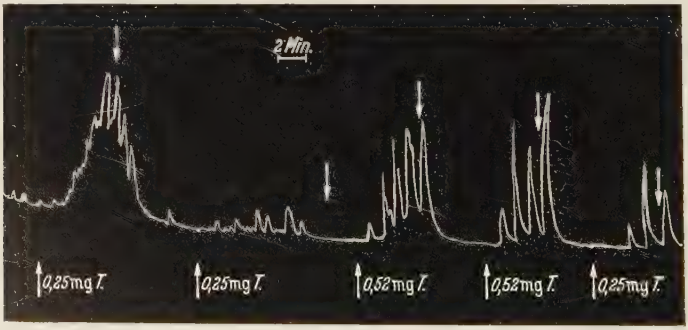


Abb. 10. Meerschweinchenuterus. Man bemerkt die unvollständige Desensibilisierung gegenüber 0,25 mg krist. Trypsin.

Abb. 11 zeigt uns die Desensibilisierung des Meerschweinchendünndarms gegenüber 0,30 ccm einer 0,1 %igen dialysierten Trypsinlösung (Schering).

Abb. 11. Meerschweinchendünndarm. Man sieht die Desensibilisierung gegenüber 0,30 mg eines dialysierten Trypsin-Handelspräparats (Schering). $H = {}^1/_{250\,000}$ verdünnte Histaminlösung.

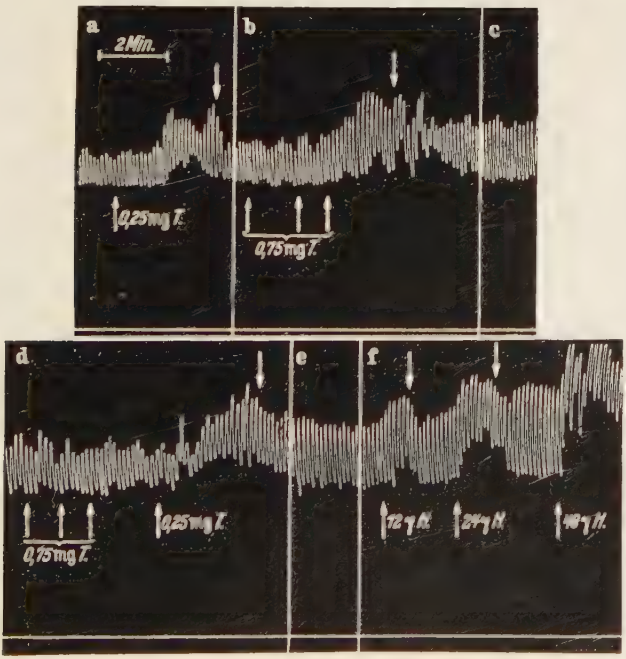


Abb. 12. Kaninchendünndarm. Desensibilisierung gegenüber stufenweise steigenden Dosen von krist. Trypsin. In Teil *f* Reaktionen auf 12, 24 und 48 γ Histamindichlorhydrat.

Die gleiche Desensibilisierung läßt sich nach Verabreichung größerer Trypsingaben am Kaninchendünndarm beobachten. In Abb. 12 ist die Desensibilisierung zunächst gegenüber 0.25 mg, nachher 0,75 mg Trypsin klar zu erkennen.

Der in Abb. 13 wiedergegebene Versuch zeigt uns sehr klar einen Fall von unvollständiger Desensibilisierung des Meerschweinchenuterus gegenüber 0,25 mg krist. Trypsin. Die zwei Komponenten des Vorgangs, die Verlängerung der Latenzzeit und die Abnahme der Reaktionsintensität sind deutlich zu erkennen. In einigen Versuchen war diese Verlängerung der Latenzzeit besonders ausgeprägt. Von einigen Sekunden bei der

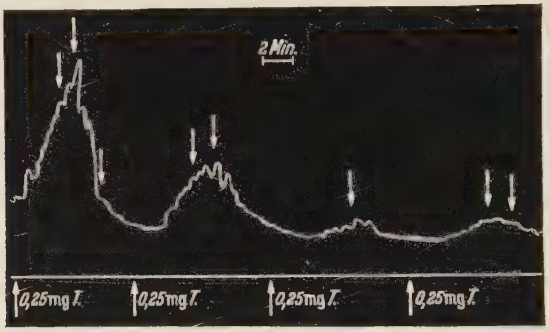


Abb. 13. Partielle Desensibilisierung des Meerschweinchenuterus gegenüber 0,25 mg krist. Trypsin. Man beachte die Verlängerung der Latenzzeit und die Abnahme der Reaktionsintensität.

ersten Kontraktion stieg dieselbe nach wiederholtem Vorangehen gleicher Fermentdosen auf 4—5 Minuten!

e) Die pharmakologischen Wirkungen des Trypsins können von ihren schädlichen Wirkungen getrennt werden. Der Kaninchenuterus im Dicestrus erwies sich der Trypsinwirkung gegenüber sehr resistent. Des öfteren haben bedeutende Fermentmengen keine Wirkung hervorgerufen. Speziell die nach Burn[25] auf einen mit Tyrodelösung durchtränkten Wattebausch gelegten Uterusschnitte, die im Eisschrank aufgehoben wurden, waren der Trypsinwirkung praktisch unzugänglich. In einem unserer Versuche, in dem wir 24 Std. im Eisschrank aufbewahrtes Gebärmutterhorn verwendeten, konnten wir während 30 Min. 4 mg krist. Trypsin auf den Muskel einwirken lassen, ohne daß derselbe die geringste Reaktion gezeigt hätte. An der Kurve sah man nur einige kleine Wellenbewegungen, obwohl der Muskel auf Adrenalin sehr stark reagierte. Dieser Versuch zeigt uns ganz deutlich, daß die erregende Wirkung des Trypsins nicht durch eine unspezifische Wirkung (etwa Zerstörung der Muskelfibrillen) ausgelöst wird. Denn eine so große Trypsingabe hätte während so langer Zeit eine so starke schädliche (zerstörende) Wirkung entfalten

[25] Burn, J. H.: Methods of Biological Assay. Oxford, Univ. Press., 1928.

müssen, daß eine wahrnehmbare Reaktion der glatten Muskeln erfolgt wäre, wenn diese überhaupt durch eine Zersetzung der Muskelsubstanz hervorgerufen würde.

Demgegenüber hat in dem in Abb. 9 wiedergegebenen Versuch eine kleine Dosis des Ferments (1 γ in 30 ccm Tyrode) nach 40 Sek. Latenzzeit eine maximale Kontraktion des Meerschweinchenuterus hervorgerufen. Die in diesem Versuch verwendete geringe Fermentdosis konnte praktisch keine schädliche Wirkung hervorrufen; trotzdem reagierte der Muskel am Ende der erwähnten Latenzzeit — mit einer maximalen Kontraktion.

Diese eben erwähnten zwei Versuche weisen sehr deutlich darauf hin, daß beim Trypsin die Trennung seiner abbauenden Wirkung von seiner pharmakologischen Eigenschaft möglich ist.

f) Die Trypsinwirkung läßt sich nicht durch eine unspezifische Erregung der im Kaninchenuterus vorhandenen motorischen Sympathicusendigungen erklären. Man kann mit Sicherheit die Möglichkeit ausschließen, daß das Trypsin auf den Kaninchenuterus außer der Brunstzeit durch eine Erregung der motorischen Sympathicusendigungen wirkt:

Der diesbezügliche Versuch wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Zwei Uterushörner eines Kaninchens wurden gleich nach der Tötung des Tieres isoliert. Das eine wurde sofort nach dem Tod, das andere erst nach 20 Std. Aufbewahrung im Kühlraum geprüft. Die Versuche zeigten, daß die Trypsinempfindlichkeit der zwei Uterushörner mit ihrer Empfindlichkeit gegenüber Histamin parallel, aber keinesfalls mit ihrer Empfindlichkeit gegenüber Adrenalin, d. h. ihrem physiologischen Erreger parallel geht. Das erste Uterushorn reagierte gegenüber 0,5 γ Adrenalin, 0,25 mg Trypsin und 0,6 mg Histamin scharf, das zweite Uterushorn hat sich gegenüber 5 γ Adrenalin noch als stark empfindlich, dagegen gegenüber 3 mg Trypsin und 2 mg Histamin als völlig unempfindlich erwiesen.

II. Freiwerden von Histamin bei der Durchströmung der Lunge von Meerschweinchen mit Trypsinlösung.

Lewis und Mitarbeiter[26] nahmen an, daß ein Freiwerden von histaminähnlichen Substanzen eine erste Abwehrreaktion der Zellen gegenüber irgendeinem schädlichen Agens wäre. Im Anfang ist die Identifizierung dieser „H-Substanz" mit Gewebshistamin auf Schwierigkeiten gestoßen. So hat z. B. Krogh[27], obwohl er mit der Lewisschen Hypothese einverstanden war, die Existenz von 2 Substanzen für möglich gehalten. Eine derselben sollte sich durch hohe Diffusionsfähigkeit auszeichnen und das Histamin selbst sein, dagegen sollte die andere schwer dialysierbar sein. Er benannte dieselbe deswegen als „H-Kolloid". Nach Dale[28] wiederum

[26] Lewis, T.: The blood vessels of the human skin. London 1927. — [27] Krogh, A.: Anatomy and Physiology of capillaries. New Haven 1929. — [28] Dale, H. H.: Lancet **216**, 1232 (1929).

sollen sowohl die Lewissche H-Substanz als auch das Kroghsche H-Kolloid in einer Gruppe von miteinander lose zusammengefügten molekularen Verbindungen eingeschlossen sein, aus der das Histamin, sobald die Zelle von irgendeiner schädlichen Substanz angegriffen wird, in Freiheit gesetzt werden kann.

Der Mechanismus, durch den diese lockere Histamin-Gewebssubstanzverbindungen gesprengt werden, ist für das Verständnis der in den Entzündungsherden vor sich gehenden Prozesse überaus wichtig. Dadurch erklärt sich die ständige Aufmerksamkeit, mit der Feldberg und Kellaway[29], Feldberg und O'Connor[30], Kellaway und Mitarbeiter[31], Garan[32], Bachmann[33] und viele andere die Natur derjenigen Substanzen studieren, welche imstande sind, Histamin in Freiheit zu setzen. Die Arbeiten der erwähnten Autoren beschäftigen sich jedoch mit der Erforschung der Einflüsse von schädlichen Substanzen, wie von Schlangengiften, Bakterientoxinen, Pepton, $HgCl_2$, Giftgasen, welche alle dem lebenden Organismus fremd sind.

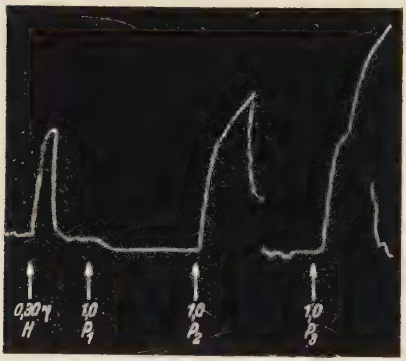


Abb. 14. Meerschweinchendünndarm. Wirkung der Lungendurchströmungsflüssigkeit von Meerschweinchen IV. (P_1) vor, (P_2) und (P_3) nach der Fermenteinspritzung.

Nun ist aber bekannt, daß während der Entwicklung eines Entzündungsvorganges der Gehalt an proteolytischen Enzymen in den Exsudaten ständig zunimmt (Müller[34], Opie[34], Weiss und Mitarbeiter[35]). Die vollständige Klarlegung der Entzündungsprozesse, besonders in bezug auf die erhöhte Durchlässigkeit der Kapillaren, ist nur möglich auf Grund von Kenntnissen darüber, ob ein proteolytisches, beim p_H der lebenden Gewebe aktives Ferment imstande ist, an die Gewebskolloide locker gebundenes Histamin freizumachen.

Wir haben Versuche an den Lungen von 5 Meerschweinchen durchgeführt. Das Organ wurde von der Art. Pulm. aus mit anaphylaktischer Ringerlösung (nach Dale)[19] durchströmt und dieser Trypsin zugegeben. Die Perfusionsflüssigkeit wurde alle 15—20 Min. mittels Meerschweinchendünndarms auf ihren Histamingehalt geprüft. Abb. 14 zeigt die Wirkung

[29] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: J. Physiol. (Brit.) **90**, 257 (1937). [30] Feldberg, W., u. W. J. O'Connor: Ebenda **90**, 288 (1937). — [31] Kellaway, C. H., H. F. Holden u. E. R. Trethewie: Austral. exper. Biol. a. med. Sci. **16**, 331 (1938). — [32] Garan, R. S.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 250 (1938). — [33] Bachmann, H.: Ebenda **190**, 345 (1938). — [34] Siehe bei V. Menkin: Physiol. Rev. (Am.) **18**, 366 (1938). [35] Weiss, C., A. Kaplan u. C. E. Larson: J. biol. Chem. (Am.) **125**, 247 (1938).

von je 1 ccm dreier mit 20 Min. Intervall gewonnener Proben einer Durchströmungsflüssigkeit. Die erste Probe, welche vor der Trypsineinspritzung gewonnen wurde, erwies sich als vollkommen inaktiv, führte sogar eine geringe Tonuserschlaffung herbei. Die Proben (P_2) und (P_3) wurden 20 bzw. 40 Min. nach der Einführung der Trypsinlösung in die Durchströmungskanüle entnommen.

Aus Abb. 15 ist die Menge des aus den fünf durchströmten Lungen freigewordenen Gesamthistamins ersichtlich.

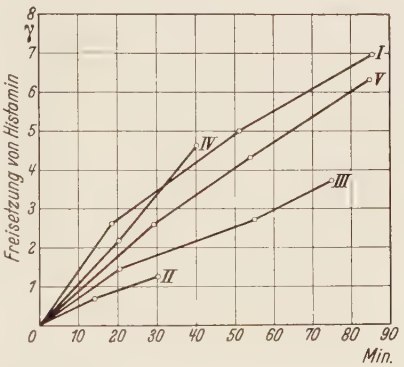


Abb. 15. Histaminmengen, die in den 5 Lungendurchströmungsversuchen mit Trypsin freigeworden sind. Ordinate: freigewordene Histaminmenge in γ, die in den einzelnen Fraktionen gefundenen Mengen wurden summiert. Zur Durchströmung gelangte bei I bis IV eine 2 %ige Lösung käuflichen Trypsins und zwar bei I 1,5; bei II 1,0; bei III 3,0; bei IV 4,0 ccm. Bei V wurden 2,0 ccm einer 1 %igen Lösung dialysierten käuflichen Trypsins verwendet.

Wir glauben, daß die beschriebenen Tatsachen zur Kenntnis der für das Verständnis zahlreicher Erkrankungsprozesse überaus wichtigen Beziehung

gebundenes Histamin → freies Histamin

einen Beitrag liefern. Wir werden weiter unten sehen, daß die Freimachung des Gewebshistamins durch die Einwirkung des Trypsins die erste Stufe in dem Abbauvorgang der Gewebseiweißkörper sein muß. In der Tat darf man annehmen, daß freiwerdendes Histamin die Mehrzahl der vom Trypsin verursachten pharmakologischen Wirkungen des Trypsins auf die lebenden Gewebe ausübt. Ob dieses plötzliche Freiwerden des Histamins eine Äußerung des von Lewis und Mitarbeiter angenommenen Verteidigungsmechanismus oder ob es bloß eine Folgeerscheinung der spezifischen Trypsinwirkung, d. h. der dadurch bedingten Proteolyse ist, läßt sich auf Grund der uns bis jetzt zur Verfügung stehenden experimentellen Resultate nicht entscheiden.

Besprechung der Ergebnisse.

Die vom Trypsin auf die glatte Muskulatur der Säugetiere ausgeübte Wirkung läßt sich erklären, wenn man die Vermittlung einer durch das proteolytische Ferment aus den Geweben freigemachten, aktiven Substanz annimmt. In der Tat weisen die Versuche, in denen wir eine, von kleinen

Dosen Trypsins bedingte Desensibilisierung der Muskeln feststellen konnten, darauf hin, daß die Trypsinwirkung eine indirekte ist. Das Desensibilisierungsphänomen, wie es beim Schlangengift (Kellaway[5]), Bienengift (Feldberg und Kellaway[14], Richter[13]) und bei dem anaphylaktischen Schock „in vitro" (Schultz[36], Dale[37]) beobachtet wurde, zwingt zu der Annahme, daß irgendeine Substanz verbraucht wird. Im Falle des Schlangen- und Bienengiftes ist die Natur dieser verbrauchten Vermittlersubstanz noch unbekannt (Histamin? Lipoide, welche in Lysocithin umgewandelt werden können?). Was den „in vitro" auftretenden anaphylaktischen Schock des sensibilisierten Meerschweinchenuterus und -darms anbelangt, so ist die verbrauchte Substanz zweifellos der sogenannte anaphylaktische Antikörper. Im Falle des Trypsins nehmen wir an, daß der aktive Vermittler seiner Wirkung auf die glatte Muskulatur das freigewordene Histamin ist. Wir fassen den Verlauf dieses Vorgangs so auf, daß die erste Stufe des Eiweißabbaues in einer fast augenblicklichen Freisetzung des Histamins bestehen muß. Diese wird durch die Annahme verständlich, daß Histamin an die äußerste, also von dem Ferment unmittelbar angegriffene Eiweißschicht gebunden ist. Diese Annahme würde die Tatsache, daß schon 1 γ des krist. Trypsins innerhalb 1 Minute am Meerschweinchenuterus eine maximale Kontraktion hervorruft (Abb. 9) erklären. Es ist sonst schwer vorstellbar, daß eine so geringe Trypsinmenge in 30 ccm Tyrode (Endkonzentration 1 : 30000000!) ausreicht, um einen nennenswerten Abbau der Gewebseiweißkörper in einer so kurzen Zeit hervorzurufen. Eine weitere Freisetzung von Histamin wäre dann unter völliger Zerstörung der erwähnten äußersten Proteinschicht möglich, und während dieser Zeit würde sich der Muskel als desensibilisiert erweisen.

Gerade die Fähigkeit, in so geringen Konzentrationen eine pharmakologisch aktive Substanz in Freiheit zu setzen, hat uns das Studium der Pharmakologie des Trypsins besonders interessant gemacht. Schon lange ehe es morphologisch wahrnehmbare Schädigungen in Gestalt von Hämorrhagien und Nekrosen verursacht, scheint das Trypsin imstande zu sein, Wirkungen, welche denen des Histamins vergleichbar sind, zu entfalten.

Zugunsten der Annahme, daß der Vermittler der Trypsinwirkung das Histamin ist, wollen wir die folgenden Tatsachen anführen:

1. Das Trypsin ist imstande, in den mit seiner Lösung durchströmten Lungen Histamin freizumachen.

2. Die von uns als Versuchsobjekte verwendeten Organe zeigten, was ihre Trypsinempfindlichkeit anbelangt, die gleiche Reihe wie hinsichtlich ihrer Histaminempfindlichkeit, und zwar:

[36] Schultz, W. H.: J. of Pharm. **1**, 549 (1910). — [37] Dale, H. H.: Ebenda **4**, 167 (1913).

Meerschweinchenuterus > Meerschweinchendünndarm > Katzendünndarm > Kaninchendünndarm > Rattendünndarm > Kaninchenuterus im Dioestrus > Mäusedünndarm.

Besonders hervorzuheben ist, daß der letztere, welcher Histamin gegenüber unempfindlich ist, sich auch dem Trypsin gegenüber refraktär zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte sich der besonders histaminempfindliche Meerschweinchenuterus auch dem Trypsin gegenüber schon in einer Verdünnung von 1 : 30000000 empfindlich.

3. Von den in lebenden Geweben normalerweise vorkommenden aktiven Substanzen (Gewebshormonen) wie Adenosin, Cholin, Azetylcholin, Histamin können wir in den Atropinversuchen das Cholin und Azetylcholin ausschließen. Die Substanzen der Adenosingruppe üben, mit Ausnahme des Meerschweinchenuterus, auf alle glatten Muskeln eine erschlaffende Wirkung aus.

Gegen die Histaminhypothese würde eine einzige Tatsache sprechen, nämlich die am jungfräulichen Rattenuterus tonuserregende Wirkung des Trypsins. Von den bekannten aktiven Substanzen können nur das Cholin und Azetylcholin die glatten Muskeln dieses Organ erregen (siehe bei Gaddum[38]), allerdings wird diese Wirkung von Atropin aufgehoben. Wir sahen aber, daß die tonuserregende Wirkung des Trypsins von Atropin auch nicht im Falle des jungfräulichen Rattenuterus aufgehoben wird. Wir nehmen an, daß in diesem Fall die Vermittlung einer bis jetzt unbekannten Substanz im Spiele ist, um so mehr, als sich der jungfräuliche Rattenuterus gegenüber Schlangengift und (in Anaphylaxieversuchen) gegenüber Antigen ebenso verhielt.

Zusammenfassung.

1. Es wurde die Wirkung von kristallinischem Trypsin auf die glatten Muskeln des Meerschweinchen-, Katzen-, Hunde-, Ratten-, Mäuse- und Kaninchendünndarms, sowie auf den Meerschweinchenuterus, auf die Gebärmutter des Kaninchens im Dioestrus, schließlich auf den jungfräulichen Rattenuterus untersucht. Im weiteren sind in der Arbeit an der Meerschweinchenlunge ausgeführte Durchströmungsversuche beschrieben.

2. Das Trypsin wirkte tonuserregend auf alle hier untersuchten glatten Muskelarten; eine Ausnahme bildete nur der Mäusedarm, dem gegenüber das Trypsin unwirksam war.

3. Es wird eine von uns als Trypsinsensibilisierung benannte Erscheinung beschrieben: Die Wiederholung der gleichen Trypsingaben ruft geringere Reaktionen mit verlängerten Latenzzeiten hervor. Dieses Phänomen ist von allgemeinem Charakter und läßt sich fast bei allen untersuchten Muskelarten beobachten.

[38] Gaddum, J. H.: Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe. Leipzig 1936.

4. Eine vorausgehende Atropinbehandlung des Katzendünndarms und des jungfräulichen Rattenuterus hat auf die Intensität der von Trypsin hervorgerufenen Reaktion keine Wirkung ausgeübt.

5. Es ist uns gelungen, die pharmakologische Wirkung des Trypsins von seiner in bezug auf lebende Gewebe bestehenden verdauenden Wirkung zu trennen.

6. In Durchströmungsversuchen, in denen isolierte Meerschweinchenlungen verwendet wurden, konnten durch Trypsininjektionen in die Arterienkanüle nachweisbare Histaminmengen in Freiheit gesetzt werden.

7. Es wird die Hypothese begründet, daß die Trypsinwirkung indirekt durch Freisetzung von Histamin in der eigentlichen Muskelsubstanz erfolge.

Aus dem Instituto Biologico in São Paulo, Brasilien.

Beiträge zur Pharmakologie des Trypsins.

II. Wirkung des Trypsins auf den Blutkreislauf bei Katze, Kaninchen und Hund.

Von

M. Rocha e Silva.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. August 1939.)

In der vorangehenden Arbeit[1] haben wir nicht nur die Wirkung des Trypsins in einer Tyrodelösung auf isolierte Säugetierorgane gezeigt, sondern auch seine Fähigkeit, in den durchströmten Meerschweinchenlungen Histamin in Freiheit zu setzen. Wir haben die große Ähnlichkeit hervorgehoben, welche zwischen der Trypsinwirkung auf die glatte Muskulatur des Säugetierdünndarms und -uterus und den Wirkungen besteht, die gewisse tierische Gifte und bakterielle Toxine zeigen.

Die vorliegende Arbeit beweist die starke Giftigkeit des von uns benutzten kristallinischen Trypsins, welche in gewisser Weise der des Schlangengiftes ähnlich ist. Die bei Katzen, Kaninchen und Hunden hervorgerufenen Kreislaufwirkungen ähneln den Wirkungen, welche nach den Beobachtungen von Kellaway und Le Mesurier[2], Feldberg und Kellaway[3,4,5,6] unter gleichen Bedingungen durch Schlangen- bzw. Bienengift hervorgerufen werden.

Die weiter unten zu beschreibenden Ergebnisse, die die Giftigkeit der intravenösen Trypsininjektionen beweisen, sind um so interessanter, als die Frage der Giftigkeit des Trypsins von jeher ein Gegenstand der Diskussion war. Alle bis jetzt durchgeführten Trypsinversuche wurden mit mehr oder minder unreinen Präparaten entweder subcutan oder intraperitoneal durchgeführt. Dabei war die nekrotisierende Wirkung des Ferments Gegenstand zahlreicher Versuche, aber seine Giftigkeit wurde nie einwandfrei bewiesen. Noch neuerdings schreiben Dragstedt und Mitarbeiter[7]: It is probable that trypsin has no corrosive properties in it, which would injure living tissues.

[1] Rocha e Silva, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 335 (1940).
[2] Kellaway, C. H., u. D. H. Le Mesurier: Austral. J. exper. Biol. a. med. Sci. **14**, 57 (1936). — [3] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: Ebenda **15**, 81 (1937).
[4] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: Ebenda, S. 159. — [5] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: Ebenda, S. 441. — [6] Feldberg, W., u. C. H. Kellaway: Ebenda, S. 461. — [7] Dragstedt, L. R., H. E. Haywood u. J. C. Ellis: Arch. Surg. (Am.) **28**, 232 (1934).

Im Jahre 1882 haben v. Bergmann und Angerer[8] zum ersten Male nachgewiesen, daß das subcutan verabreichte Trypsin imstande ist, Fieber und Nekrose hervorzurufen.

Achalme[9] hat die lokale Erweiterung der Kapillaren und die damit verbundene Diapedesis der roten Blutkörperchen als Folge von subcutan verabreichten Pankreasextrakten beschrieben. Mueck[10] und Rosenbach[11] haben unter dem Mikroskop die Reihenfolge der Erscheinungen, welche nach der Injektion eines Handelspräparats von Trypsin an der Froschzunge auftraten, verfolgt. Sie haben die Erweiterung der Kapillaren, Diapedesis der roten Blutkörperchen und infolge der Kapillarwandschädigungen auftretende Blutungen gesehen. Nach diesen Verfassern würde das Trypsin durch ein Gefäßgift wirken, welches im Laufe des Abbaues der Gewebeeiweißkörper in Freiheit gesetzt wird. v. Bergmann[12] und Bamberg[13] zeigten, daß die intraperitoneale Verabreichung eines Trypsinhandelspräparats giftig ist. Loeper und Esmonet[14] beschreiben toxische Wirkungen (Albuminurie und Glykosurie) als Folge von subcutan verabreichtem Trypsin. Der größte Impuls für das Studium der durch intravenöse Pankreasextraktinjektionen hervorgerufenen schädigenden Wirkungen war zweifellos die Entdeckung eines bei Menschen vorkommenden Krankheitskomplexes, der Pankreatitis haemorrhagica acuta (Pankreasnekrose). Seit den Arbeiten von Guleke[15], Polya[16], v. Bergmann und Guleke[17] und von anderen wurde angenommen, daß die Krankheitserscheinungen der Pankreasnekrose mit der Aktivierung des Pankreastrypsinogens durch Galle oder durch Bakterien zusammenhängen. Nach Kirchheim[18] und Pfeiffer[19] wäre das charakteristische Symptom der Trypsinvergiftung eine schwere Störung der Temperaturregulierung. Batelli und Stern[20] haben Stoffwechselstörungen als Folgen von Injektion von Handelstrypsinpräparaten beobachtet. Boerner-Patzelt[21] zeigte, daß die charakteristischsten Schädigungen, welche Injektionen von Pankreasautolysaten bei der Maus hervorrufen, sich auf die Gefäße und auf die Nebennieren beschränken. Pfeiffer und Standenath[19] schrieben dem Reticuloendothelialsystem eine wichtige Rolle bei den Trypsinvergiftungen zu. Schittenhelm und Weichardt[22] haben die vollkommene Unschäd-

[8] v. Bergmann, E., u. Angerer (1882): Siehe bei Oppenheimer, C.: Die Fermente und ihre Wirkung. 2. Band. Leipzig, G. Thieme, 1926. — [9] Achalme, P.: Ann. Inst. Pasteur, Par. **15**, 737 (1901). — [10] Mueck, H.: Slg. klin. Vortr. Chir. **167**, 215 (1910). — [11] Rosenbach, F.: Arch. klin. Chir. **94**, 403 (1911). — [12] v. Bergmann, G.: Siehe bei Oppenheimer, C.: l. c. — [13] Bamberg (1909): Siehe bei Oppenheimer, C.: l. c. — [14] Loeper u. Esmonet: C. r. Soc. Biol. **65**, 996 (1908). — [15] Guleke, N.: Arch. klin. Chir. **85**, 644 (1908). — [16] Polya, E.: Pflügers Arch. **121**, 61 (1906). — [17] v. Bergmann, G., u. N. Guleke: Münch. med. Wschr. **57**, 1673 (1910). — [18] Kirchheim, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **74**, 374 (1913). — [19] Pfeiffer, H., u. F. Standenath: Klin. Wschr. **1922** II, 1933; **1923** I, 499. — [20] Batelli, F., u. L. Stern: Biochem. Z. **34**, 263 (1911). — [21] Boerner-Patzelt, D.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **99**, 253 (1923). — [22] Schittenhelm u. Weichardt (1912): Siehe bei Oppenheimer: l. c.

lichkeit ihrer Trypsinpräparate bei intravenöser Verabreichung im Gegensatz zu den Folgen der subcutanen und intraperitonealen Einverleibung gezeigt.

Sämtliche obenerwähnten Versuche, welche mit nicht ganz reinen Präparaten durchgeführt wurden, müssen als ungeeignet betrachtet werden, wenn es sich um die endgültige Entscheidung der Trypsingiftigkeit handelt. Denn die auf den proteolytischen Effekt des Trypsins zurückgeführten Krankheitserscheinungen können sehr wohl durch die Verunreinigung der verwendeten Präparate entstanden sein. Diese Überlegung hat Oppenheimer[8] zu der folgenden Aussage veranlaßt: „Ein Gift im eigentlichen Sinne ist also Trypsin geradesowenig wie andere Fermente."

In der letzten Zeit haben Rich und Duff[23] im Laufe ihrer mit dem kristallinischen Präparat von Kunitz und Northrop durchgeführten Versuche Gefäßschädigungen, begleitet von Nekrose und lokalen Hämorrhagien, nach subcutan verabreichtem Trypsin gesehen. Auf diese Weise konnten sie bestimmte Beziehungen zwischen den durch Trypsin hervorgerufenen Gefäßschädigungen und ähnlichen für die Pankreasnekrose charakteristischen Veränderungen nachweisen: This vascular necrosis is the direct result of the action of pancreatic juice upon the walls of the vessels, and the agent in the juice responsible for this necrosis is the tryptic ferment.

Hinweise auf die Giftigkeit des kristallinischen Trypsins befinden sich ferner in einer Arbeit von Ten Broeck[24]. In der letzten Zeit haben Friedmann und Katz[25] eine Niereninsuffizienz beschrieben, welche nach der Injektion eines gereinigten Trypsinpräparats in die Art. renalis entstanden ist. In allen oben beschriebenen Versuchen wurden Giftwirkungen festgestellt, die viele Stunden nach der Injektion auftraten. Sie unterscheiden sich dadurch von den von uns durchgeführten Experimenten, in welchen die unmittelbaren Wirkungen eines kristallinischen Trypsinpräparats festgestellt wurden, die in einigen Sekunden, höchstens einigen Minuten nach der Injektion auftreten.

Methodik.

In allen unseren Versuchen haben wir ein nach der Methode von Kunitz und Northrop[26] hergestelltes kristallinisches Trypsinpräparat verwendet[27]. Dies Präparat enthielt auf jeden Gewichtsteil Trypsin die gleiche Menge wasserfreien Magnesiumsulfats.

In einigen Versuchen kam das Trypsin frei von Mg-Salz zur Verwendung. Das Salz wurde eliminiert durch eine entsprechend lange währende Dialyse gegen N 100 HCl im Eisschrank. Als in der Außenflüssigkeit kein

[23] Rich, A. R., u. Duff, L.: Bull. John Hopkins Hosp. **58**, 212 (1936). — [24] Ten Broeck, C.: J. biol. Chem. (Am.) (1934). — [25] Friedmann, M., u. L. N. Katz: J. exper. Med. (Am.) **68**, 485 (1938). — [26] Kunitz, M., u. J. Northrop: J. gen. Physiol. (Am.) **19**, 991 (1935). — [27] Für die freundliche Überlassung dieses Präparats sind wir Herrn Prof. J. Northrop besonders dankbar.

SO_4 mehr nachweisbar war, wurde die Dialyse, gleichfalls im Eisschrank, 2 Tage hindurch gegen Tyrodelösung fortgesetzt. Die Außenflüssigkeit wurde zweimal täglich gewechselt. Für die Injektionen von kleinen Mengen (0,5 und 1 mg) haben wir die Trypsinlösung nach der von uns früher beschriebenen Methode hergestellt [28].

Die Kaninchen wurden mit Hedonal (Bayer) anästhesiert, von dem sie 0,5 mg pro kg Körpergewicht in alkoholischer Lösung und intramuskulär bekamen. Bei Katzen verwendeten wir 0,11 g pro kg Körpergewicht Chloralose (Merck) in der gleichen Verabreichungsform wie Hedonal. Den Hunden gaben wir 1 Std. vor der Äthernarkose 20 mg Morphiumchlorhydrat pro kg Körpergewicht.

Der Druck in der Art. pulmonalis wurde mit Hilfe einer in den Ramus lat. sin. eingebundenen Kanüle gemessen. Um diese Messung zu ermöglichen, wurde der Brustkorb nach Beginn der künstlichen Atmung geöffnet, der obere linke Lungenlappen mittels einer Ligatur von seiner Wurzel getrennt und die Kanüle in den entsprechenden Ast der Arterie eingebunden.

Die Injektionen wurden im allgemeinen bei den Kaninchen in die Ohrvene direkt, bei den Katzen und Hunden mittels einer in die Vena femoralis eingebundenen Kanüle ausgeführt.

Versuchsergebnisse.

I. Kreislaufwirkungen bei Katzen. Die Injektion von 0,1 bis 0,5 mg Trypsin pro kg Körpergewicht lösten in der Regel eine fast sofortige starke und anhaltende Senkung des Carotisdrucks aus. Stärkere Dosen (0,5—1 mg pro kg Körpergewicht) verursachten in der Mehrzahl der Fälle einen tödlichen Kreislaufkollaps und den Stillstand der Atembewegungen.

Abb. 1 zeigt die blutdrucksenkende Wirkung des (durch Dialyse $MgSO_4$-frei gemachten) Trypsins, das in Dosen von 0,12—0,63 mg verabreicht war. Eine Gabe von 0,6 mg pro kg rief einen schweren, nur unvollständig kompensierten Kreislaufkollaps hervor. Eine darauffolgende nochmalige Drucksenkung hat den sofortigen Tod des Tieres herbeigeführt. Bei der markierten Stelle (×) sieht man den vollkommenen Stillstand der Atembewegungen, worauf sich das Tier sehr unruhig benahm.

Die Verabreichung von stärkeren Dosen wie 1—2 mg pro kg Körpergewicht hat immer einen, einige Sekunden nach der Trypsininjektion beginnenden Kollaps mit tödlichem Ausgang verursacht.

Abb. 2 gibt uns einen typischen, an einer Katze von 2 kg Körpergewicht durchgeführten Versuch wieder. Man sieht, daß die Verabreichung von 3 mg Trypsin einen tödlichen Druckabfall verursachte. Gleichzeitig wurde auch Respirationsstillstand beobachtet.

[28] Rocha e Silva, M.: Zit. S. 351, Fußnote 1.

Die gleiche Wirkung haben wir an zwei anderen Katzen beobachtet. Die erste (Körpergewicht 2.7 kg) bekam 10 mg kristallinisches, jedoch nicht dialysiertes Trypsin in die Vena femoralis. 10 Sekunden später begann eine rapide Blutdrucksenkung, die in 4—6 Sekunden von 125 mm Hg auf 20 mm Hg herunterging. 10 Minuten später war der Druck nur noch 10 mm Hg und man konnte keine Anzeichen einer Erholung beobachten (Einspritzung von 10 mg wasserfreiem $MgSO_4$ in die gleiche Vene hatte nur eine geringe Druckerhöhung in der Carotis verursacht). Die andere Katze (Körpergewicht 2.3 kg) bekam gleichfalls in die Art. femoralis 3 mg Trypsin. 10 Sekunden später stellte sich die gleiche Drucksenkung ein, so daß der Carotisblutdruck innerhalb von 10—12 Sekunden von 120 mm Hg auf 25 mm Hg herunterging. Am Ende der ersten Minute war der Druck nur

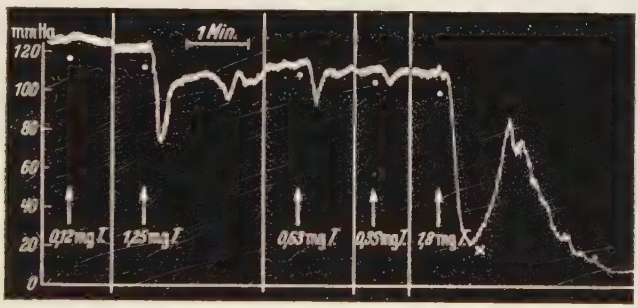


Abb. 1. Carotisdruck einer 3,1 kg schweren Katze. Die Pfeile zeigen die Injektionen der angegebenen Trypsinmengen an.

noch 7 mm Hg und in einigen Minuten ging das Tier ohne die mindesten Anzeichen einer beginnenden Druckerhöhung ein.

Aus diesen Versuchen folgt, daß weniger als 1,5 mg pro kg Körpergewicht krist. Trypsins genügt, um bei Katzen den Tod herbeizuführen.

Bei sämtlichen rapid eingegangenen Katzen konnten wir eine starke Ausdehnung der rechten Herzhälfte und sehr häufig die des Pulmonarstammes beobachten. Dieser Befund hat uns veranlaßt, die Druckänderungen in dem Stamm der Art. pulmonalis nach den Trypsininjektionen zu untersuchen.

Abb. 3 zeigt uns die Wirkung wiederholter Injektionen von 0,25 mg an einer Katze von 2.5 kg Körpergewicht. Man sieht, daß gleichzeitig mit der Senkung des Carotisdrucks der Druck in der Art. pulm. sehr rasch und dauernd steigt. Wiederholt man nun die gleiche Dosis von 0,25 mg des Trypsins, so nimmt die Reaktionsintensität progressiv ab. Dieses Desensibilisierungsphänomen läßt sich mit der an fast allen glatten Säugetiermuskeln beobachteten ähnlichen Erscheinung vergleichen.

Die in Abb. 4 wiedergegebenen Kurven stellen die Fortsetzung von Abb. 3 dar. Die Verabreichung einer tödlichen Trypsindosis hat einen starken Spasmus in dem kleinen Kreislauf hervorgerufen, welcher eine

starke Erhöhung des Druckes in der Art. pulm. bewirkt, mit einer entsprechenden zum Tod führenden Senkung des Carotisdrucks.

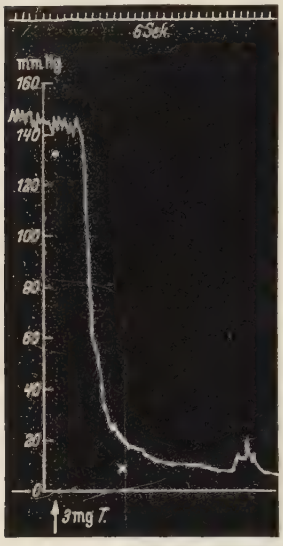


Abb. 2. Katze, 2 kg. Carotisdruck. Kollaps nach 1,5 mg Trypsin pro kg.

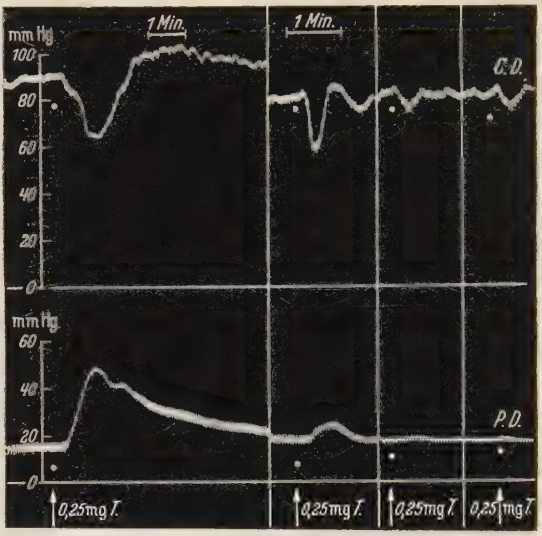


Abb. 3. Katze, 2,5 kg. Die obere Kurve entspricht dem Carotis-, die untere dem Pulmonalisdruck.

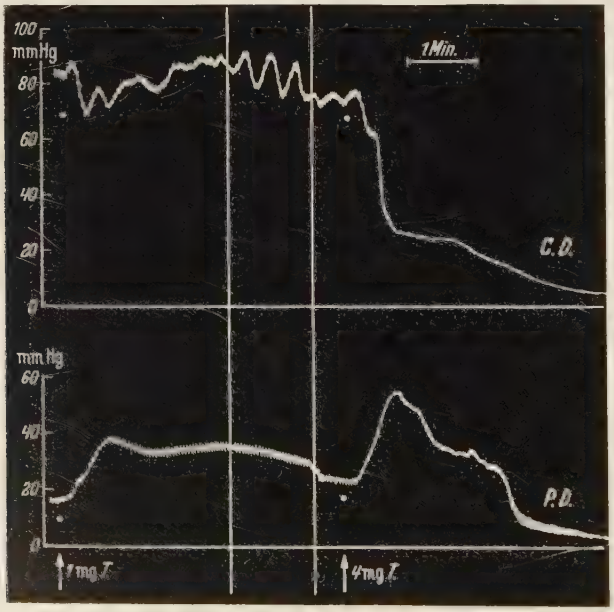


Abb. 4 (Fortsetzung von Abb. 3). Obere Kurve = Carotisblutdruck; untere Kurve = Druck in der Art. pulmonalis.

Aus den oben beschriebenen Versuchen läßt sich folgern, daß Trypsin in Dosen von 0,1—0,5 mg pro kg Körpergewicht bei Katzen eine Blutdrucksenkung hervorruft, welche fast vollkommen verschwindet. Dosen, welche über 0,6 mg pro kg Körpergewicht hinausgehen, verursachen in der Regel einen Kollaps mit tödlichem Ausgang. Dieser Druckabfall und Tod sind wahrscheinlich auf eine mehr oder minder starke Stauung in dem kleinen Kreislauf zurückzuführen.

II. Kreislaufwirkung bei Kaninchen. Die bei Kaninchen beobachteten Wirkungen sind denen, die wir in bezug auf die Katze beschrieben haben, sehr ähnlich. Mäßige Trypsindosen verursachen eine plötzliche

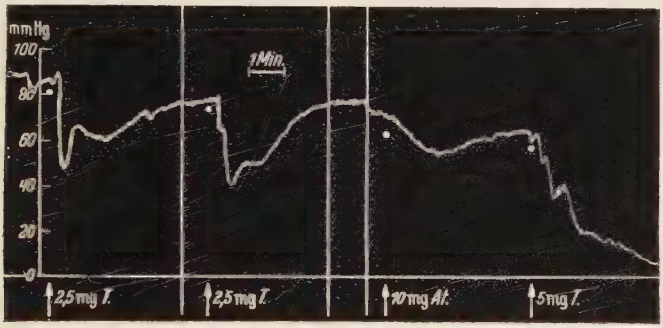


Abb. 5. Kaninchen, 1,7 kg. Carotisblutdruck. T. = krist. Trypsin. At. = Atropin.

Senkung des arteriellen Druckes, welche aber einmal rascher, einmal langsamer verschwindet. Starke Fermentdosen verursachen eine tödliche Drucksenkung in der Carotis.

Abb. 5 gibt einen an einem Kaninchen von 1,7 kg durchgeführten Versuch wieder. Zur Verwendung kam durch längere Dialyse $MgSO_4$-frei gemachte Trypsinlösung. Man sieht, daß zwei Injektionen von je 2,5 mg Trypsin jedesmal eine deutliche Drucksenkung hervorgerufen haben, welche nur langsam zurückging.

Das Kaninchen zeigte sich der drucksenkenden Wirkung des Trypsins gegenüber widerstandsfähiger als die Katze. Dosen zwischen 0,5 und 2 mg verursachten im allgemeinen nur eine mehr oder minder dauerhafte Senkung des Carotisblutdrucks. Wie Abb. 5 beweist, bekam ein Kaninchen von 1,7 kg einen tödlichen Kollaps erst nach der Injektion von 5 mg Trypsin, d. h. 3 mg pro kg Körpergewicht. Die intravenöse Verabreichung von 10 mg Atropin konnte die letale Wirkung des Trypsins nicht aufhalten.

Wiederholte Injektionen der gleichen Trypsindosen lösten meistens eine Abnahme der Reaktionsintensität aus. Abb. 6 zeigt uns diese partielle Desensibilisierung, wie sie nach wiederholten Injektionen einer geringen Fermentmenge entsteht.

Die Sektion der nach Trypsininjektion plötzlich eingegangenen Kaninchen wies immer auf eine Stauung in dem kleinen Kreislauf hin, d. h. es fand sich eine Erweiterung des rechten Herzens und des Art. pulm.-Stammes. Diese Veränderungen waren denen, die an Katzen beobachtet wurden, vollkommen gleich. Der linke Ventrikel enthielt dagegen nur einige Tropfen Blutes.

Abb. 7 zeigt uns einen typischen Versuch, in dem sowohl der Carotis- (obere Kurve) als auch der Pulmonalisdruck (untere Kurve) registriert wurden. Man sieht, daß gleichzeitig mit dem Druckabfall in der Carotis

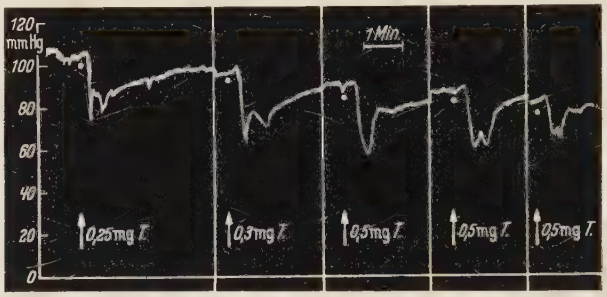


Abb. 6. Kaninchen von 1,25 kg. Carotisblutdruck.

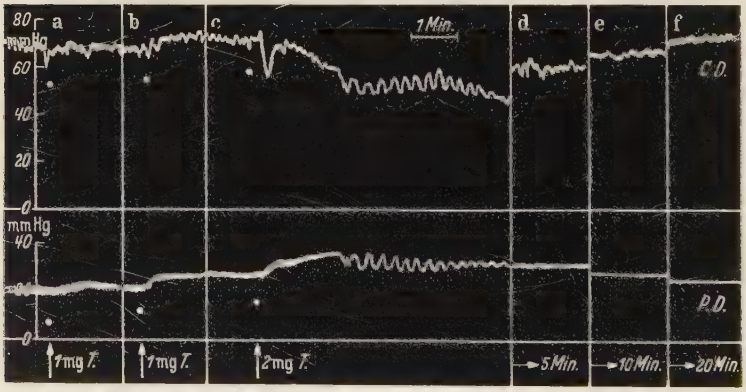


Abb. 7. Kaninchen. Carotisblutdruck (obere Kurve) und Pulmonalisblutdruck (untere Kurve).

der Druck in der Art. pulm. zu steigen anfing. In den Abschnitten *d*, *e*, *f* sieht man die langsame Wiederherstellung der normalen Druckverhältnisse in den beiden Arterien.

Diese deutliche Stauung im kleinen Kreislauf vermag wohl den nach Trypsininjektion auftretenden Druckabfall in der Carotis zu erklären.

III. Kreislaufwirkungen beim Hund. Die in bezug auf Katzen und Kaninchen beschriebene druckerniedrigende Wirkung wurde auch bei Hunden beobachtet. Obzwar beim Hund die von Trypsin verursachten Kreislaufstörungen nicht so weit verfolgt wurden, daß man die genaue Dosis festgestellt hätte, welche eben ausreicht, um den tödlichen Kollaps

herbeizuführen, zeigten die Versuche doch, daß Hunde gegenüber der blutdrucksenkenden Wirkung des Trypsins äußerst empfindlich sind. Dosen, die zwischen 0.05 und 0,1 mg pro kg Körpergewicht lagen, haben immer eine rasche und ausgeprägte Drucksenkung in der Carotis verursacht.

Abb. 8 zeigt einen Versuch, welcher an einem Hund von 6 kg durchgeführt wurde. Man sieht, daß nach Injektion von 1 mg Trypsin, d. h. 0,17 mg pro kg (in die Vena femoralis), der Druck von 130 mm Hg auf 80 mm Hg zurückgeht, aber bald seinen normalen Wert annähernd wieder erreicht; die dreimal wiederholte Verabreichung von 1 mg Trypsin ruft einen progressiven Druckabfall hervor. Der im Anfang 120 mm Hg entsprechende Druck beträgt nach der dritten Injektion nur noch 90 mm Hg.

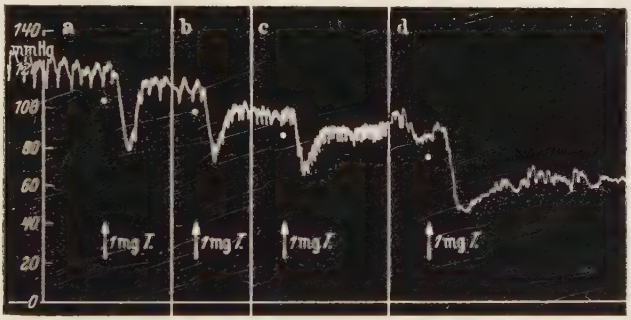


Abb. 8. Hund. Körpergewicht 6 kg. Carotisblutdruck. *a*, *b* und *c* Injektionen in die Ven. fem., *d* Injektion in die Pfortader.

Abschnitt *d* zeigt uns die Wirkung von 1 mg Trypsin, das in die Pfortader injiziert wurde. Man sieht die lange anhaltende Senkung und die unvollständige Wiederherstellung, so daß der Druck lange Zeit unter dem Anfangswert bleibt.

Obwohl — wie gesagt — die Kreislaufwirkungen beim Hund nicht sehr eingehend verfolgt wurden, scheint uns festzustehen, daß beim Zustandekommen der druckerniedrigenden Wirkung des Trypsins der Leber eine besonders wichtige Rolle zukommt.

Besprechung der Ergebnisse.

In einer vorangehenden Arbeit[1] haben wir versucht, die tonussteigernde Wirkung des Trypsins auf glatte Muskeln der Säugetiere durch seine Histamin mobilisierende Fähigkeit zu erklären. In dieser Hinsicht bestehen zwischen der Pharmakologie des Trypsins und der tierischen und bakteriellen Gifte verschiedene Berührungspunkte. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Berührungspunkte auf Grund der Ähnlichkeit in den Kreislaufstörungen, welche sowohl vom Trypsin als auch von den erwähnten Giften hervorgerufen werden, vermehrt.

Die einwandfreie blutdrucksenkende Wirkung kleiner Dosen von krist. Trypsin ließe sich leicht durch die Annahme erklären, daß das intravenös

verabreichte Trypsin die Fähigkeit besitzt, aus den lebenden Geweben Histamin in Freiheit zu setzen.

Wir sahen uns genötigt, die Hypothese über die Histaminfreisetzung zu erweitern, indem wir annahmen, daß das Freiwerden dieser Substanz der ersten Stufe eines Abbaues der Gewebsproteine entspricht. Die Vorstellung eines fast unmittelbaren Freiwerdens von Histamin würde die meisten pharmakologischen Trypsinwirkungen deuten lassen. Besonders der bei Katzen gleich nach der Fermentinjektion auftretende tödliche Kollaps sowie die beim Hund beobachtete Blutdrucksenkung lassen an das sofortige Freiwerden eines so stark drucksenkenden Stoffes, wie es das Histamin ist, denken.

Zwar besteht der Einwand, daß beim Kaninchen das intravenös gegebene Histamin gewöhnlich eine Drucksteigerung verursacht. Aber von Ackermann und Kutscher[29], Dale und Laidlaw[30], Feldberg[31] wurde des öfteren auch eine blutdrucksenkende Wirkung des Histamins, und zwar gerade beim Kaninchen, festgestellt. Wir selbst verfolgten im einzelnen die Frage und stellten fest, daß die vorherrschende Histaminwirkung die blutdrucksenkende ist[32]. Im übrigen ist der Weg des intravenös injizierten Histamins

zuführendes Gefäß—kleiner Kreislauf—Herz—arterielles System—Kapillaren—venöses System

verschieden von dem des in den Geweben freigewordenen Histamins:

Kapillaren—venöses System—kleiner Kreislauf—Herz—arterielles System.

Nun hat jeder Abschnitt des Zirkulationsapparats seine eigene Bedeutung für die Regulierung des Blutdrucks. Die Wirkung des Histamins in den gesperrt gedruckten Abschnitten ist vorwiegend vasodepressorisch.

Eine eindrucksvolle Analogie zu der Trypsinwirkung beim Kaninchen bietet der anaphylaktische Schock, der gewöhnlich als Folge einer Histaminabspaltung in den Geweben interpretiert wird, und zwar gerade beim Kaninchen[33]. Im übrigen sind bei diesem Tier die konstantesten Zeichen des anaphylaktischen Schocks das Absinken des arteriellen Druckes (Arthus[34], Scott[35], Auer[36], Bally[37]) und das Ansteigen des Druckes im Stamm der Arterie pulmonalis (Airila[38], Drinker und Bronfenbrenner[39]). Diese beiden Reaktionen sind beim Kaninchen charakteristische Symptome der Trypsinvergiftung.

[29] Ackermann, D., u. F. Kutscher: Siehe bei W. Feldberg u. E. Schilf: Histamin. Berlin, Jul. Springer, 1930. — [30] Dale, H.H., u. P. P. Laidlaw: J. Physiol. (Brit.) **41**, 318 (1911). — [31] Feldberg, W.: Ebenda **63**, 211 (1927). — [32] Rocha e Silva, M.: Unveröffentlicht. — [33] Gaddum, J. H.: Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe. Leipzig, G. Thieme 1936. — [34] Arthus, M.: De l'anaphylaxie à l'immunité. Paris, Masson et Cie., 1921. — [35] Scott, W. M.: J. Path. a. Bacter. **15**, 31 (1911). — [36] Auer, J.: J. exper. med. (Am.) **14**, 476 (1911). — [37] Bally, L. H.: J. Immunol. (Am.) **17**, 223 (1929). — [38] Airila, Y.: Skand. Arch. Physiol. **31**, 388 (1914). — [39] Drinker, C. K., u. J. Bronfenbrenner: J. Immunol. (Am.) **9**, 387 (1924).

Die Analogie zwischen dem anaphylaktischen Schock und der Trypsinvergiftung erstreckt sich auch auf die Katze. In der Tat scheint in beiden Fällen eine Stauung im kleinen Kreislauf die wichtigste Ursache des Abfalls des in den Carotiden herrschenden Druckes zu sein.

Beim Hund gilt seit den klassischen Arbeiten von Manwaring und Mitarbeitern[40, 41] die Leber als das Schockorgan, sei es, weil diese beim Hund als wichtigster Histaminspeicher anzusehen ist, oder als Reservoir des anaphylaktischen Antikörpers, oder auch, weil eine lokale Histaminabspaltung eine sehr starke Wirkung auf die Muskulatur der Venae suprahepaticae ausübt. Diese Muskulatur aber ist bekanntlich nach Mautner und Pick[42, 43] der Hauptschlüssel für die peripherische Regulierung des Blutdrucks beim Hund. So haben auch wir festgestellt, daß die intraportale Injektion des Trypsins eine viel deutlichere Blutdrucksenkung im Gefolge hat, als die Injektion derselben Menge des Ferments in die Vena femoralis.

Die Beziehungen zwischen den mannigfaltigen Phänomenen des anaphylaktischen Schocks in den verschiedenen Tierklassen und den von uns beschriebenen charakteristischen Erscheinungen bei der Trypsinvergiftung scheinen uns sehr wichtig zu sein und werden den Gegenstand einer dritten Mitteilung bilden.

Zusammenfassung.

1. Versuche über die Wirkung eines kristallinischen Trypsinpräparats auf den Kreislauf von Katze, Kaninchen und Hund werden beschrieben.

2. Trypsin in geeigneten Mengen übt bei allen untersuchten Tierarten eine deutliche drucksenkende Wirkung aus.

3. Wir haben festgestellt, daß bei Katzen die Injektion von 0,5—1 mg pro kg und bei Kaninchen die von 1,5—2,5 mg pro kg Körpergewicht einen Kreislaufkollaps, danach Atemstillstand und Tod verursacht.

4. Bei Katzen und Kaninchen haben wir nach akutem Trypsintod stets klare Beweise einer Stauung im kleinen Kreislauf beobachten können. Die gleichzeitige Registrierung des Carotis- und Pulmonalisdrucks bei diesen Tieren zeigt, daß der Druckabfall in der Carotis mit einer Druckerhöhung in der Arteria pulmonalis zusammenfällt.

5. Beim Hund zeigte sich die intraportale Trypsingabe wirksamer als die Injektion derselben Dosis in die Femoralvene, insofern als sie eine länger anhaltende Blutdrucksenkung bewirkte.

6. Die Hypothese einer plötzlichen Histaminabspaltung in den Geweben als Ursache der blutdrucksenkenden Trypsinwirkung wird diskutiert.

7. Es wird auf die Ähnlichkeit der Kreislaufwirkungen des Trypsins mit analogen Wirkungen gewisser tierischer Gifte und Antigene (bei sensibilisierten Tieren) hingewiesen.

[40] Manwaring, W. H., V. M. Hosepian, J. R. Enright u. D. F. Porter: J. Immunol. (Am.) **10**, 567 (1925). — [41] Manwaring, W. H., V. M. Hosepian, F. J. O'Neill u. H. B. Moy: Ebenda **10**, 575 (1925). — [42] Mautner, H., u. E. P. Pick: Biochem. Z. **127**, 72 (1921). — [43] Mautner, H., u. P. Pick: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **142**, 271 (1929).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Innsbruck.

Über die Wirkung von Oxydantien (Kaliumpermanganat, Benzoesäureperoxyd, Chinon), Veratrin und Mistel auf die Dynamik des Froschherzens.

Von

H. Richter.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Dezember 1939.)

Das Veratrin [1], die Mistel [2] und die Oxydantien wirken auf das Froschherz tonisierend. Vom $KMnO_4$ hatte De Jongh [3] berichtet, daß es die glatte Muskulatur zur Kontraktion bringt und das nach Straub isolierte Froschherz unter Verkleinerung der Ausschläge schädigt; unveröffentlichte Versuche von C. Henze am hiesigen Institut zeigten jedoch später, daß das $KMnO_4$ und das $NaMnO_4$, aber auch Benzoesäureperoxyd und Chinon, die zum Vergleich als Oxydantien anderer Art geprüft wurden, typisch tonisierende Herzgifte sind (Abb. 1); auch der Arsenwasserstoff, bei dessen Umwandlung mit dem Auftreten peroxydartiger Zwischenkörper zu rechnen ist [4], H_2O_4 und die Osmiumsäure erwiesen sich unter gewissen Bedingungen als tonisierend wirksam. Die jüngst von E. Sanders [5] beschriebene systolisierende Wirkung von oxydiertem Adrenalin dürfte danach wohl auch auf einer Chinonwirkung beruhen.

Die Tonisierung gehört zu den Grundwirkungen der Glykoside der Digitalisgruppe; ihr Einfluß auf die Dynamik des Froschherzens wurde von Frank [6], Straub [7], R. Sanders [8], Sulzer [9] sowie Junkmann [10] untersucht und es ist gezeigt worden, daß das Strophanthin die Schädigung des Herzens durch Calciummangel auch in dynamischer Hinsicht auszugleichen vermag (Geiger und Jarisch [11], Junkmann [10]). Da war es nun von Interesse zu prüfen, wie Stoffe ganz anderer Konstitution, die mit der Digitalisgruppe nur die systolisierende Wirkung gemein haben, auf die Dynamik des Froschherzens wirken. Die Frage war als Beitrag

[1] Boehm, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **71**, 269 (1913). — [2] Ebster, H. u. A. Jarisch: Ebenda **145**, 297 (1929). — [3] De Jongh, S. E.: Arch. internat. Pharmacodynam. **46**, 239 (1933). — [4] Henze, C.: Klin. Wschr. 1938, S. 24; Jung, F.: Biochem. Z. **302**, 294 (1939). — [5] Sanders E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 572 (1939). — [6] Frank, O.: Z. Biol. **32**, 370 (1895); Sitzungsber. Ges. Morph. u. Physiol. München. **14**, 14 (1898). — [7] Straub, W.: Z. exper. Path. u. Ther. **1**, 489 (1905). — [8] Sanders, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **125**, 358 (1927). — [9] Sulzer: Z. Biol. **92**, 562, 571 (1932). — [10] Junkmann, K.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **105**, 169 (1925).

zur allgemeinen Pharmakologie herztonisierender Wirkungen gedacht und reizvoll, weil man bei den Oxydantien versucht ist, sich Bestimmtes über die Art ihrer chemischen Einwirkung auf das lebende Substrat zu denken.

Methodik.

Die Versuche wurden in der Zeit von Mai bis November an Esculenten unter Verwendung der von Geiger und Jarisch [11] beschriebenen Apparatur angestellt. Diese Versuchsanordnung ist nicht ideal; Mängel sind, daß zum Zwecke genügender O_2-Versorgung reichlich mit O_2-gesättigtem Ringer gespült werden muß, weshalb

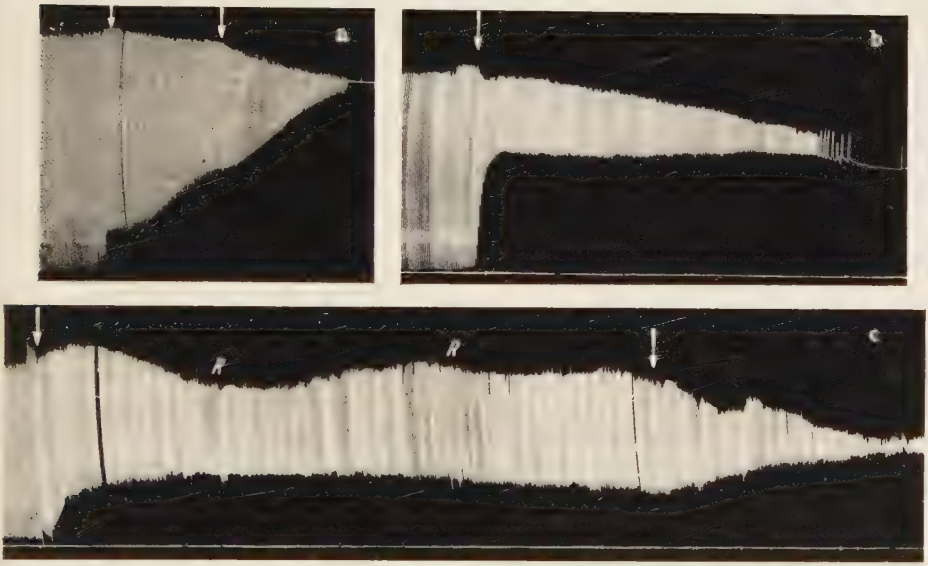


Abb. 1. Esculentenherz an der Straubschen Kanüle. a) ▼ Kaliumpermanganat 1:50000 in Ringer; b) ▼ Chinon 1:10000; c) ▼▼ Benzoesäureperoxyd 1:50000, *R* = Ringer.

eine Auswaschhypodynamie entstehen kann, daß das Prinzip der Isotonie nicht streng gewahrt ist, weil der Strömungswiderstand in den Kanülen nicht minimal ist und ferner, daß Veränderungen der Dynamik durch Störungen der Frequenz und Koordination möglich sind, doch konnte ich mich da vor Täuschungen schützen, indem ich alle Versuche ausschied, in denen jene Störungen auftraten. Andererseits hat die Versuchsanordnung den Vorteil der Einfachheit und für meine vorwiegend vergleichenden Zwecke genügt sie völlig.

Das Benzoesäureperoxyd wurde frisch aus Benzoylsuperoxyd nach Botwinik und Gawrilow [12] hergestellt. Die Mistel kam vorwiegend in Form von Kaltwasserextrakten aus Blätterpulver zur Anwendung, doch wurde auch die nach Winterfeld [13] hergestellte herzwirksame Fraktion aus Viscum album geprüft. Ich ließ die in Ringer gelösten Substanzen unter niedrigem Drucke mit einer Geschwindigkeit von etwa 3 ccm in der Minute durch das Herz fließen und prüfte dann von Zeit zu Zeit das dynamische Verhalten.

[11] Geiger, E., u. A. Jarisch: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **94**, 52 (1922).
[12] Botwinik u. Gawrilow: J. prakt. Chem. **148**, 180 (1937). — [13] Winterfeld, K.: Sc. Pharmaceutica, Beilage der Wiener Pharmaz. Wschr. **9**, 105 (1938).

A. Versuche am ungeschädigten Herzen.

$KMnO_4$ ist in einer Konzentration von 1 : 250000 innerhalb der ersten 10 Minuten ohne Einfluß und bewirkt nach 30 Minuten eine leichte Abnahme der isometrischen Maxima, wobei die isotonischen Dehnungskurven unverändert bleiben. Es wird also die systolische Herzkraft leicht geschädigt.

Bei einer Konzentration von 133000 nehmen nach 5 Minuten die isotonischen Minima und Maxima ab (Abb. 2a), wobei sich das Schlagvolumen vermindert; der Herzmuskel wird also tonisiert. — Die isometrischen Maxima verhalten sich in dieser Phase der Wirkung verschieden: teils bleiben sie unverändert, teils nehmen sie zu (Abb. 2b). Dabei dürfte es sich aber um eine

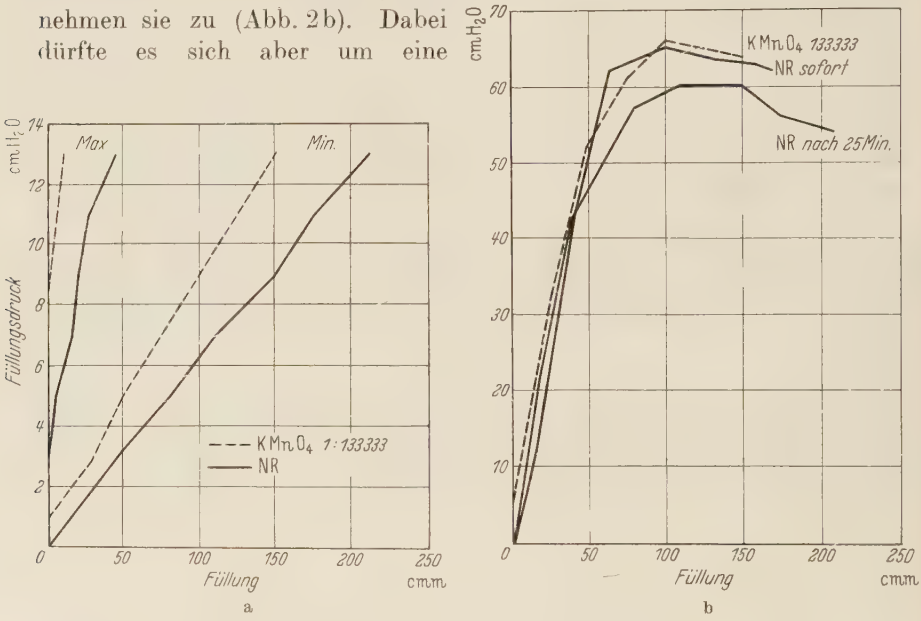


Abb. 2. Wirkung von Kaliumpermanganat auf das normale Froschherz. *NR* = Normalringer a) isotonische Minima und Maxima; b) isometrische Maxima.

„pseudopositive" Wirkung am leicht hypodynamen Herzen handeln, denn um konstante Ausgangswerte zu erhalten und das Herz ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen, mußte es in der Vorperiode wiederholt gespült werden und dabei sanken, wie auch aus der Abb. 2b ersichtlich ist, die isometrischen Maxima häufig etwas ab. Anstiege über das Optimum des frischen Herzens hinaus wurden nie beobachtet. Im weiteren Verlaufe der Behandlung mit $KMnO_4$ 1 : 130000 traten ausgesprochene Schädigungen auf: zunächst wird die systolische Entleerung fortschreitend unvollständiger, wobei die Schlagvolumina kleiner werden und auch die isometrischen Maxima abnehmen. Etwas später blähen sich

die Vorhöfe plötzlich stark auf, die AV.-Klappen werden undicht und es kommt zu Rhythmusstörungen; dann wurden die Versuche abgebrochen.

Grundsätzlich übereinstimmende Ergebnisse erhielt ich mit Benzoesäureperoxyd (1 : 100000), Chinon (1 : 100000 – 1 : 50000) sowie mit der Mistel; von dieser entsprachen 1 : 15000 Kaltextrakt etwa $KMnO_4$ 1 : 250000 und 1 : 2000 etwa 1 : 133000. Diese Stoffe ergaben somit in einer ersten Phase Tonisierung, häufig mit Abnahme des Schlagvolumens und Zunahme der isometrischen Maxima (das ist der „Herzkraft"), jedoch nicht über das Optimum des frischen Herzens hinaus; eine zweite, spätere Phase war ausgesprochen schädigend.

Beim Veratrin liegen die Verhältnisse insofern etwas anders, als an den Volumenkurven die tonische Wirkung nicht so eindeutig dargestellt werden konnte. 1 : 250000 veränderte die isotonischen Kurven nicht, verminderte jedoch bereits die isometrischen Ausschläge und führte schon nach 10 Minuten zu Vorhofblähung und Koordinationsstörung.

B. Versuche am durch Ca-Mangel geschädigten Herzen.

Die Wirkung des $KMnO_4$ soll an Hand der Abb. 3a und 3b erläutert werden. Unter dem Einfluß von Ringer mit $^1/_3$ Ca wird das Herz dehnbarer; die Dehnungskurve der isotonischen Minima und Maxima rückt nach rechts (Abb. 3a). Nach 10 Minuten $KMnO_4$ 1 : 250000 in Ringer mit $^1/_3$ Ca erscheint die Störung nicht nur ausgeglichen, sondern sogar überkompensiert, denn man findet die Dehnungskurven jetzt links von der Ausgangslage. Auch die Schädigung der Kontraktionskraft wird ausgeglichen; die isometrischen Maxima, die stark abgefallen waren, steigen trotz des Ca-Mangels wieder fast bis zum Ausgangswerte an (Abb. 3b). Höhere Konzentrationen lassen eine ähnliche Wirksamkeit erkennen, haben aber bald toxische Folgen. Das $KMnO_4$ vermag somit in geeigneten Konzentrationen die bei Ca-Mangel auftretenden Störungen der Herzdynamik weitestgehend auszugleichen.

Mit Benzoesäureperoxyd wurden völlig übereinstimmende Ergebnisse erhalten. Mit Chinon gelang die Besserung des Ca-Mangelschadens hingegen nicht so vollkommen, weil frühzeitig die toxischen Wirkungen eintraten. Bei Konzentrationen von 1 : 200000 war die Kräftigung des mit $^1/_3$ Ca gespeisten Herzens immerhin so deutlich, daß die Analogie mit den anderen Oxydantien nicht bezweifelt werden kann *.

Veratrin und Mistel (Rohextrakt) behoben den Ca-Mangelschaden vollkommen. Die Dehnungskurven rückten wie beim $KMnO_4$ sogar unter

* Anmerkung: Am nach Straub isolierten Froschherzen ist die Gegenwirkung der Oxydantien gegen den Ca-Mangel nicht so leicht nachweisbar. Das dürfte damit zusammenhängen, daß das Herz bei meiner Versuchsanordnung fortlaufend mit niedrigen Konzentrationen gespült wird, wobei die Wirkung langsam einsetzt und sich nur allmählich verstärkt, was zum mindesten das Auffinden der optimalen Wirkungsbedingungen erleichtert.

den Ausgangswert herab, so daß die Herzen, trotzdem das Calcium weiter vermindert blieb, stärker tonisiert erschienen als zu Beginn und die isometrischen Maxima stiegen wieder zur ursprünglichen Höhe an.

Einige Versuche wurden auch mit der Winterfeldschen[13] herzwirksamen Fraktion aus Viscum album angestellt, die im hiesigen pharmakognostischen Institute von Fischer gewonnen worden war. Auch damit ließ sich die Gegenwirkung gegen den Ca-Mangel zeigen, doch erwies sich die gereinigte Substanz toxischer als der Rohextrakt; während es bei diesem leicht ist, die „therapeutische" Konzentration festzustellen und zwischen völliger Wirkungslosigkeit und toxischer Wirkung hindurchzufinden, gelingt dies bei dem Winterfeldschen Stoffe oft nicht. Die größere Toxizität des gereinigten Wirkstoffes der Mistel, die auch Fischer[14] am ganzen Tiere feststellte, dürfte wohl damit zusammenhängen, daß der Stoff im Rohextrakt an größere Komplexe gebunden auftritt oder durch Schutzkolloide so beeinflußt wird, daß sein Eindringungs- und Haftvermögen verändert wird; bei der Reinigung könnte der Wirkstoff sozusagen freigelegt werden.

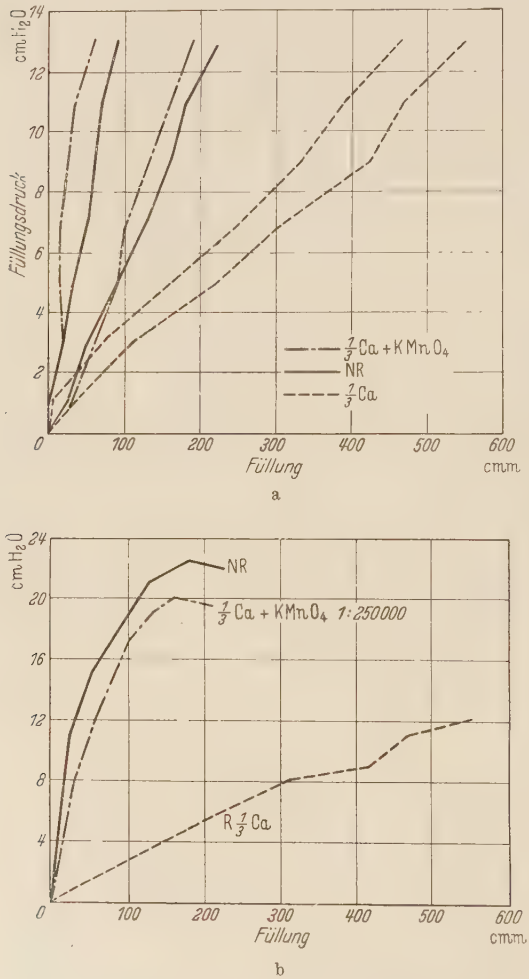


Abb. 3. Wirkung von Kaliumpermanganat auf das durch Ca-Mangel geschädigte Froschherz. *NR* = Normalringer, $^1/_3$ Ca = Ringer mit $^1/_3$ Calciumgehalt.

Besprechung der Ergebnisse.

In erster Linie interessiert der Vergleich zum Strophanthin. Im allgemeinen sind die Wirkungen von $KMnO_4$, Benzoesäureperoxyd, Chinon, Veratrin und Mistel auf die Dynamik des normalen und des durch Ca-Mangel geschädigten Herzens ähnlich denen des Strophanthins, doch ergeben sich auch Abweichungen.

[14] Fischer, R., u. D. Toth: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 472 (1939).

Zunächst die Ähnlichkeiten:

Die Schädigungen durch Ca-Mangel werden hier wie da in der gleichen Weise eindeutig behoben.

Am ungeschädigten Herzen sinken wenigstens bei den Oxydantien und der Mistel die Füllungen der isotonischen Minima und Maxima unter Abnahme der Schlagvolumina; das Herz wird also, ähnlich wie bei der fortgeschrittenen Strophanthinwirkung (Sulzer [9], Geiger und Jarisch [11]) tonisiert.

Die isometrischen Maxima, von denen beim Strophanthin teils angegeben wird, daß sie zunehmen (Sulzer [9], R. Sanders [8], Straub [7]), teils daß sie unverändert bleiben (Frank [1], Geiger und Jarisch [11]), zeigen auch bei den Oxydantien und der Mistel eine deutliche Zunahme; da diese jedoch niemals den Wert bei Beginn der Versuche übertraf und bei meinen Versuchen mit einer gewissen Auswaschhypodynamie zu rechnen ist, dürfte es sich um einen „pseudopositiven Effekt" im Sinne Straubs handeln, wie er für die analogen Beobachtungen beim Strophanthin erwogen wurde (Weese [15]).

Der Befund, daß nach Veratrin und Mistel bei Ca-Mangel die Neigung zum Auftreten von Arrhythmien geringer ist als bei normaler Ca-Diät, steht in Übereinstimmung mit den analogen Beobachtungen von Mandelstamm [16] sowie von La Barre und v. Heerswynghels [17] mit Strophanthin und Digitalis und den klinischen Angaben von Verstärkung der Bradycardie durch Calcium (Billigheimer [18]) und Begünstigung der Extrasystolen (Gold und Edwards [19], Böger und Diehl [20]). Bei den Oxydantien konnte ich diesen Zusammenhang nicht so eindeutig feststellen.

Abweichungen: Bei keiner der geprüften Konzentrationen konnte ich gleichzeitig Verbesserung der systolischen Entleerung und Vergrößerung der diastolischen Füllung, also Zunahme des Schlagvolumens erzielen, wie es vom Strophanthin in niedrigen Konzentrationen von Sulzer [9] angegeben wird und vielen lehrbuchmäßigen Darstellungen der Digitaliswirkung, wenigstens am Herzen des ganzen Frosches, entspricht. Bei den von mir geprüften Stoffen kam es nur zu einer Verkleinerung der isotonischen Minima bei gleichzeitiger Verkleinerung der isotonischen Maxima, meist unter Abnahme des Schlagvolumens.

Was die Behebung des Ca-Mangelschadens durch Oxydantien anlangt, so gehört dies wohl in eine Linie mit den Befunden von Krautwald und Stuhlmann [21] sowie Brock und Druckrey [22]. Diese sahen am

[15] Weese, H.: Digitalis, Thieme 1936, S. 167. — [16] Mandelstamm, M.: Z. exper. Med. **51**, 633 (1926). — [17] La Barre, J., u. J. van Heerswynghels: Arch. internat. Pharmacodynam. **61**, 233 (1939). — [18] Billigheimer, E.: Klin. Wschr. 1929, S. 724. — [19] Gold, H., u. D. J. Edwards: J. Pharmacol. (Amer.) **31**, 214 (1927). — [20] Böger, A., u. F. Diehl: Z. Klin. Med. **125**, 294 (1933). — [21] Krautwald, A., u. M. Stuhlmann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 152 (1938). — [22] Brock, N., u. H. Druckrey: Ebenda **188**, 186 (1938).

Straub-Herzen Besserung der Tätigkeit nach Ca-Mangel durch fein verteilten Quarzsand, Kaolin, Tierkohle und durch Adstringentien. Diese Befunde weisen ebenso wie meine auf einen Membranvorgang hin, denn von den Oxydantien ist nicht anzunehmen, daß sie tiefer in die Zelle eindringen, da sie sich beim Zusammentreffen mit organischen Substanzen sofort umsetzen.

Zusammenfassung.

Oxydantien (Kaliumpermanganat, Benzoesäureperoxyd, Chinon), Veratrin und Mistel wirken auf die Dynamik des isolierten Froschherzens in ähnlicher Weise ein.

Sie bewirken am ungeschädigten Herzen eine ausgesprochene Tonisierung und gelegentlich eine Steigerung der Kontraktionskraft; dabei dürfte es sich aber nur um einen „pseudopositiven Effekt" handeln. Die unter Ca-Mangel auftretenden Veränderungen der Herzdynamik werden weitgehend behoben. Höhere Konzentrationen schädigen.

Die Wirkung dieser Stoffe auf die Dynamik des Froschherzens hat viel Ähnlichkeit mit der Wirkung des Strophanthins.

Druckfehlerberichtigung.

In der Arbeit W. Straub, Z. Kanda und F. Zinnitz, Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, S. 1—15 (1939), ist beim Umbruch des Satzes folgender sinnstörender Druckfehler entstanden:

S. 7 und 8 in den Köpfen der Stäbe 2 und 4 der Tabellen (auf S. 10 nur in Stab 4) soll es heißen cmm statt ccm.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel.
(Direktor: Prof. B. Behrens.)

Brechenerregende Substanzen im Kaffee und ihre Bedeutung für die Unverträglichkeit des Kaffeegetränkes.

Von

Behrend Behrens und **Günther Malorny.**

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 6. Dezember 1939.)

Auf der XIV. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft (Berlin 1938) war der Kaffee als Genußmittel in einem ausführlichen Referat mit dem Titel „Kaffee und Coffein" eingehend behandelt worden. Der auf diesem Kongreß gepflogene Meinungsaustausch, der in den Verhandlungen der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft (1) und in einer Monographie von O. Eichler (2) niedergelegt ist, zeigte uns, daß bei der gesamten Streitfrage die Wirkungen von Kaffee und kaffeeähnlichen Getränken auf den Magen nicht genügend gewürdigt werden. Es ist seit langem bekannt, daß nervöse und insbesondere auch herzkranke Personen außerordentlich magenempfindlich sind, und es erschien uns durchaus denkbar, daß die von vielen Menschen geklagte Unverträglichkeit von Kaffeegetränken, einschließlich der nach Kaffeegenuß auftretenden Herzbeschwerden, weitgehend durch einen Reiz auf den Magen hervorgerufen sein könnte. Die Nichtberücksichtigung dieses Gedankenganges in der Diskussion erschien uns verwunderlich, zumal schon in der älteren Literatur von einem sehr angesehenen Forscher [E. Harnack (3)] auf diese Zusammenhänge hingewiesen wurde.

Zusammenhänge zwischen Magenempfindlichkeit und Herzbeschwerden sind altbekannt. Derartige Beschwerden werden meist als gastrokardialer Symptomenkomplex zusammengefaßt und ihre Ursachen mechanisch gedeutet. Es kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß insbesondere die Herzbeschwerden im wesentlichen auf eine Erregbarkeitssteigerung des vegetativen Nervensystems zurückzuführen sind. Im Zustande der Nausea liegt gleichfalls eine solche Steigerung der Erregbarkeit vor, wie man schon lange weiß. Es scheint uns deshalb der Untersuchung wert, ob im Kaffeegetränk spezifisch brechenerregende Substanzen vorhanden sind, die wie auch andere emetisch wirksame Stoffe auf dem Umwege über das vegetative Nervensystem Herzklopfen, Atembeklemmung, Aufregungszustände usw. hervorrufen können. Eine solche Vermutung könnte auch die Erklärung dafür abgeben, daß von

empfindlichen Menschen der Kaffee, aber nicht die anderen coffeinhaltigen Getränke, so schlecht vertragen wird. Die von kaffeeempfindlichen Personen angegebenen Beschwerden im Sinne der soeben näher erläuterten Alteration des vegetativen Nervensystems scheinen nicht gegen die soeben ausgesprochene Vermutung zu sprechen.

Wir kennen zwei Gruppen von Stoffen, die besondere Wirkungen auf den Magen ausüben. Die erste Gruppe umfaßt solche, die am Drüsenapparat der Magenschleimhaut angreifen, was besonders häufig bei vegetativ-stigmatisierten Menschen vorkommt, und diesen zu erhöhter Säure- und Sekretproduktion anregt, solche Beschwerden äußern sich in Sodbrennen und einem eigenartigen schmerzhaften Druckgefühl in der Magengegend. Andererseits kennen wir Substanzen, die die Magenschleimhaut direkt an den sogenannten emeticosensiblen Vagusendigungen, demnach die zentripetale Bahn des Brechreflexes, reizen; diese zweite Art der Magenalteration geht mit Übelkeitsgefühl, Brechreiz, Kontraktionen der Bauchpresse und Erbrechen einher.

Vom Kaffee wird nun behauptet, daß, wenn er vom normalen Menschen in größeren Mengen ohne oder mit Zusätzen auf nüchternen Magen, oder von magenkranken Menschen in entsprechend kleineren Mengen aufgenommen wird, sowohl erhöhte Magensaftproduktion* als auch Übelkeit und Brechreiz [Lickint (4)], ja selbst Erbrechen auftreten können. Vorweg sei erwähnt, daß es uns auch beim normalen Menschen nach Verabfolgung hoher, den Normalkonsum weit überschreitender Kaffeedosen gelang, Erbrechen zu erzielen (s. u.). Außerdem gilt als allgemeine Erfahrung, daß der Ausbruch der Seekrankheit durch Kaffee, aber nicht durch Tee beschleunigt wird.

Wir legten uns nun die Frage vor, ob im Kaffee und in kaffeeähnlichen Getränken magenreizende Stoffe der zweiten Gruppe, d. h. solcher, die die emeticosensiblen Nervenendigungen der Magenschleimhaut reizen, vorhanden seien, und welche Bedeutung ihnen für die Unverträglichkeit des Kaffeegenusses zuzumessen sei. Diese Fragestellung ist, soweit uns bekannt ist, bisher noch nicht experimentell bearbeitet worden. Um den zum Brecheffekt führenden Wirkungsmechanismus näher kennenzulernen, wurde der Hund als Versuchsobjekt gewählt, da bei ihm die magenschleimhautreizenden Substanzen durch Auslösung des Brecheffektes besonders gut und gleichmäßig nachgewiesen werden können, und da in zahlreichen Versuchen immer wieder bestätigt werden konnte, daß die Reaktion des Hundemagens auf eingebrachte Substanzen hin der des Menschenmagens weitgehend ähnelt; wie zu erwarten, erwies sich aber der Hundemagen als weniger empfindlich.

* Einige Autoren neigen dazu, dem Coffein eine besondere Bedeutung für die Magensaftproduktion beimessen zu müssen [Katsch u. Kalk (5)]. Es gibt aber auch Stimmen, die die sekretionsfördernde Wirkung des Kaffees auf die Röstprodukte zurückführen, da beim Magenblindsackhunde auch nach coffeinfreiem Kaffee eine vermehrte Magensaftproduktion gefunden wird [A. Bickel u. C. van Eweyk (6)].

In diese Untersuchungen wurden Kaffeesorten verschiedener Herkunft und verschiedenen Säuregehaltes, verschiedenartige Zubereitungen (Getränkdarstellung nach der deutschen und türkischen Methode), verschiedene Vorbehandlungen („Kaffee Hag", „Idee Kaffee"), sowie Kaffeeeinzelbestandteile, z. B. Coffein, Chlorogensäure, Ätherextrakte, ferner Kaffeezusatzstoffe, wie z. B. Zichorie, mit einbezogen, wie im einzelnen noch später ausführlicher mitgeteilt werden soll; in allen untersuchten Lösungen konnten mit Ausnahme von reinen Coffein- und Chlorogensäurelösungen und mit Ausnahme von Malzkaffeefiltraten brechwirksame Substanzen nachgewiesen werden.

Methodisches.

Wenn man in einem Naturprodukt, wie z. B. der Kaffeebohne, nach brechenerregenden Substanzen fahnden will, und dabei noch in Rechnung setzen muß, unter welchen äußeren Bedingungen, wie Bodenbeschaffenheit und Klima, dieser Naturstoff zur Entwicklung kam, und ferner, welchen Behandlungen dieser Stoff nachträglich unterworfen wurde, d. h. kurz ausgedrückt, wenn man noch Vergleiche zwischen den einzelnen verwandten Produkten ziehen soll, so wird, wenn man exakt Unterschiede feststellen will, der Mensch als Versuchsobjekt ausscheiden. Beim Brechreflex handelt es sich um einen kompliziert verlaufenden Kettenreflex, dessen Auslösung sowohl als unbedingter Reflex als auch auf dem Umwege über die Perzeption mit Hilfe eines anderen Sinnesorganes erfolgen kann. Die letztere Art der Auslösung als sogenannter bedingter Reflex prävaliert beim Menschen in besonders ausgesprochenem Maße; es gibt ja bekanntlich Menschen, die schon bei der bloßen Vorstellung einer Speise erbrechen müssen. Vergleichende Untersuchungen bei Menschen würden demnach eine Fülle von Fehlerquellen in sich bergen. Die Hauptschuld an der Kompliziertheit des Brechreflexes trägt wohl die stets vorausgehende, ziemlich lange dauernde Nausea. Wählt man hingegen das Tier als Versuchsobjekt, so wird wegen des geringeren Gefühlslebens und der damit verbundenen geringeren psychischen Beeinflußbarkeit die Auslösung des Brechaktes durch bedingte Reflexe auf ein Mindestmaß zurückgedrängt; wir konnten z. B. niemals beobachten, daß die Hunde, die manchmal längere Zeit hindurch wöchentlich zweimal in Versuch genommen wurden, vor Anstellung des Versuches erbrachen oder beim Anblick eines gerade erbrechenden Hundes auch nur nauseaartige Zustände bekamen. Um nun auch noch die empfindlichsten Sinne für die bedingte Auslösung des Brechreflexes, den Geschmacks- und den Geruchssinn, auszuschalten, gaben wir den Tieren die zu verabfolgende Flüssigkeit mittels Schlundsonde.

Nachdem wir nun nach eingehendem Studium der einschlägigen Literatur festgestellt hatten, wie unterschiedlich der auf den ersten Blick so einfach erscheinende Brechreflex im Tierreich verbreitet ist, kam als Versuchstier eigentlich nur der Hund in Frage, da der Ablauf dieses Re-

flexes beim Hund in seinen Einzelphasen am meisten dem des Menschen ähnelt; Katzen sind in der Handhabung unangenehmer und bieten zudem keinerlei Vorteile.

Da die Brechdosis für den Hund relativ hoch liegt (31–57 ccm eines Kaffeefiltrates: 1 Liter heißes Wasser auf 100 g Kaffee pro kg Hund, Tabelle 2), wurde aus Ersparnisgründen orientierungshalber die Taube als Versuchstier gewählt. Sie eignet sich aber nicht gut, da wir beobachten konnten, daß die Tiere jahreszeitliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Brechfähigkeit zeigten. So erbrachen nach unseren Erfahrungen z. B. in den Monaten November und Dezember die Tauben weder auf Brechweinstein noch auf Kupfersulfat in kleinen Dosen noch nach hohen Kaffeefiltratgaben; Erregungszustände nach Kaffee und gesteigerter Picktrieb nach Apomorphin hingegen waren deutlich. Im Sommer erbrachen dieselben Tiere auf die gleichen Dosen hin fast regelmäßig und zeigten somit eine gewisse Ähnlichkeit mit den Amphibien [Mellinger (5)], was aber einer noch eingehenderen Untersuchung bedarf. Im Frühjahr schien die Brechdosis (für Kaffee untersucht) sogar um 50 % herabgesetzt zu sein; wir haben als Erklärung die Vermutung, daß der Brechreflex zu dieser Zeit einen wichtigen physiologischen Reflex in der Brutpflege sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Tauben darstellt; zwei junge Tauben, die in der Brutpflege noch nie tätig waren, erbrachen auch im Frühjahr selbst auf die doppelte Dosis von Brechweinstein bzw. Kaffeefiltraten nicht. Als wichtigster Grund ist aber schließlich anzugeben, daß die brechenerregende Kaffeedosis wegen ihres Coffeingehaltes zu nahe bei der toxischen liegt *. Zwecks Prüfung, ob das Vorhandensein des Coffeins im Kaffee ausschlaggebend für das Zustandekommen des Kaffeeerbrechens ist, erhielten die Tauben den coffeinfreien Kaffee Hag, der auf dieselbe Weise wie der coffeinhaltige Columbia-Kaffee bereitet wurde; sie erbrachen regelmäßig; die emetischen Dosen lagen in derselben Größenordnung, ebenso der Zeitpunkt des Erbrechens.

Die wesentlichsten Versuche wurden daher am Hund angestellt. Die Tiere wurden stets schlundsondiert; es wurde streng darauf geachtet, daß sie immer nüchtern waren und daß zwischen den einzelnen Versuchen regelmäßig mehrere Tage Zwischenraum lagen, so daß eine etwaige Gastritis, die wir übrigens nie beobachteten, da die Freßlust in keinem Falle herabgesetzt war, gut abheilen konnte. Während des Versuches wurden die

* Die Tiere erbrechen regelmäßig erst auf Zufuhr von 40–50 ccm eines Kaffeefiltrats aus 1 Liter heißen Wassers auf 200 g Kaffee pro Taube (im Mittel 400 g schwer); 45 ccm Kaffeefiltrat entsprechen etwa 10 g Kaffee. Eine Gabe von 0,1 g Coffein. pur. pro Taube, in 30 ccm Wasser mittels Schlundsonde gegeben, ist bereits die letale Dosis; diese Coffeindosis für sich allein führt schon zu einem ausgesprochen toxischen Erbrechen, das, wie bei fast allen Vergiftungen, lediglich als toxisches Begleitsymptom zu werten ist. Dieses zentral bedingte Erbrechen der Taube bei Coffeinvergiftung hat demnach nichts mit dem, wie wir noch sehen werden, peripher ausgelösten Kaffeeerbrechen zu tun.

Tiere genau bezüglich des Eintritts des Erregungsstadiums (meist mit der Nausea identisch, Erregung durch eventuell resorbiertes Coffein erfolgte meist später) und des Brecheffektes beobachtet; gelegentlich, besonders wenn kein oder nur geringes Erbrechen auftrat, wurden Diarrhöen beobachtet *. Die erbrochenen Mengen wurden im Anfang genau gemessen, später geschätzt, da für die Beurteilung nur ein ungefährer Anhaltspunkt nötig war. In Vorversuchen mit indifferenten Flüssigkeiten konnte gezeigt werden, daß einem etwa 10 kg schweren Hund 400—500 ccm durch Schlundsonde verabfolgt werden können, ohne daß dies auch nur den geringsten Einfluß auf das Befinden des Tieres hat. Wenn allerdings die Brechdosis für ein Kaffeefiltrat von Columbia-Kaffee 10 : 100 bei einem Tier ermittelt war, wurde darauf geachtet, daß diese Flüssigkeitsmenge, besonders bei Verwendung von Extrakten oder Lösungen kristalliner Substanzen möglichst beibehalten wurde, da ein zusätzlicher Dehnungsreiz möglich, wenn auch nicht wahrscheinlich, war, wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist. Hier wurde die Brechdosis für Columbia-Kaffee 5 Hunden als doppelt konzentriertes Filtrat gegeben, wobei die Flüssigkeitsmenge entsprechend auf die Hälfte reduziert war; die Tiere erbrachen zum überwiegenden Teile, bei den übrigen trat besonders stark ausgeprägte Nausea auf. Dieser Versuch wurde vor allen Dingen aber deswegen angestellt, um festzustellen, ob eine Steigerung der Konzentration zu der Annahme einer damit erfolgten Erhöhung der Brechdosis berechtigt. Der Extraktverlust bei gesteigerter Konzentration wird gering, wenn man das Kaffeefiltrat gemäß der Deutschen Methode durch Abnutschen mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe herstellt, so daß das Kaffeepulver immer von neuem mit reinem Wasser gleichsam ausgewaschen wird. Um zu prüfen, ob die Auswaschung bei Anwendung der Deutschen Methode wirklich hochgradig ist, laugten wir den Kaffeegrund von 10 Hundebrechdosen (10 : 100) intensiv mit siedendem Wasser aus; es gelang nicht, auch nur eine einzige Brechdosis zu gewinnen; die Trockensubstanz dieses Filtrats betrug 0,44 %. Wegen der guten Extraktausbeute glauben wir berechtigt zu sein, die Brechdosis mit annähernder Genauigkeit in g Kaffee pro kg Hund angeben zu dürfen.

Wir legten Wert darauf, für die Ermittlung der Grenzbrechdosen bei den Hunden ein und dieselbe Sorte Columbia-Kaffee, die noch dazu aus der gleichen Ernte stammte, zu verwenden, da die einzelnen Kaffeesorten (s. Tabelle 3) sich voneinander, wenn auch nicht wesentlich, unterscheiden.

Über den Zeitpunkt des Eintritts des Brecheffektes wäre noch zu sagen, daß rasch eintretendes Erbrechen als Überdosierung zu deuten war, wenn

* Diese Beobachtung steht auch im Einklang mit den Befunden, die W. Stepp (6) beim Menschen gemacht hat. Danach traten, zumal bei bestehendem Magendarmkatarrh, vertärkte Diarrhöen auf.

gleichzeitig sehr viel erbrochen wurde. Mit zunehmendem Zeitintervall wurde wegen erfolgter Resorption die erbrochene Menge immer geringer.

Für den Hund ist schließlich noch als charakteristisch zu nennen, daß er selten mehrmals erbricht; meist entleert er seinen Mageninhalt auf einmal oder in kurz aufeinanderfolgenden Schüben; im Gegensatz hierzu erbricht die Taube 1—5mal mit Zeitintervallen von 2—8 Minuten, und zwar auch nach coffeinfreiem Kaffee, so daß die zentrale Rhythmik, als Zeichen zentraler Erregung, nicht etwa durch resorbiertes Coffein zustande kommt.

Nach diesen Vorbemerkungen muß es möglich sein, durch Auswahl des geeigneten Tieres mit Hilfe verschiedener Arten der Applikation die brechwirksamen Substanzen im Kaffee zu erkennen.

Die Höhe der Kaffeedosis zur Erzielung des Brecheffektes.

Ehe wir uns unseren experimentellen Befunden an den Versuchstieren zuwenden, wird es notwendig sein, grundsätzlich zur Dosisfrage Stellung zu nehmen. Wie wir im vorherigen Abschnitt gesehen haben, ist die Kaffeebrechdosis für den Hund sehr hoch gelegen; es wäre nun aber gefährlich und geradezu falsch, wollte man von kg Hund auf kg Mensch schließen, da die Größe des Säugetiermagens nicht linear mit dem Körpergewicht steigt und auch der Grad der Magenempfindlichkeit in den einzelnen Tierklassen verschieden ist.

In Versuchen an einem normalen, nüchternen, 80 kg schweren Menschen trat nach Genuß von 6 Tassen eines unbehandelten Columbia-Kaffeefiltrats 10 : 100 ohne Zusätze nach etwa 10 Minuten Nausea und nach etwa 30 Minuten Erbrechen ein; die Brechdosis betrug demnach 1,13 g Kaffee pro kg Körpergewicht. Bei niedrigerer Dosierung kam es lediglich zur Entwicklung einer Nausea.

Wir möchten an dieser Stelle einen Fall von Kaffeevergiftung (7), bei dem es auch zu Erbrechen kam, erwähnen, wo aber offensichtlich stark überdosiert wurde: es wurden nämlich 250 g feingemahlener Kaffee mit 0,5 Liter siedendem Wasser übergossen; nach 5 Minuten langem Ziehenlassen wurde die Flüssigkeit durch ein Tuch abgepreßt und getrunken.

Die Abhängigkeit von der Höhe der Kaffeedosis für das Zustandekommen der Nausea bzw. des Erbrechens läßt es als wahrscheinlich erscheinen, daß die im Kaffee vorkommenden brechenerregenden Substanzen unter die Emetica zu rechnen sind. Es ist in diesem Zusammenhange interessant, auf die engen Beziehungen zwischen expektorierender und emetischer Wirkung einiger Pharmaca hinzuweisen. Die Radix Ipecacuanha z. B. wirkt beim Menschen in einer Dosis von 0,05—0,2 expektorierend, in einer Dosis von 1,0—2,0 brechenerregend. Nach klinischen Erfahrungen reagieren magenempfindliche Menschen nach Verabfolgung der expektorationsfördernden Dosis von R. Ipecacuanha häufig bereits mit Nausea, gelegentlich sogar mit Erbrechen.

Auf Grund unserer Beobachtung halten wir es für möglich, daß Kaffee in geringer, d. h. in üblicher Dosierung, die Expektoration fördert und erst

in sehr hoher Dosierung emetisch wirkt. Für Zichorie, die in ihrer brechenerregenden Wirkung dem Kaffee am nächsten steht, scheint dies in noch höherem Maße zu gelten.

Ermittlung der Brechdosis beim Hund.

Schon die orientierenden Versuche zeigten, daß Kaffeefiltrat bei Hunden und Tauben, durch Schlundsonde verabfolgt, Erbrechen mutmaßlich durch Reizung der Magenschleimhaut auszulösen vermag. Weiterhin zeigte sich, daß die Schuld für die Brechwirkung des Kaffees nicht dem Coffein zugemessen werden kann, da das Vergiftungsbild des Coffeins einen ganz andersartigen Verlauf zeigt, wie weiter unten näher erläutert werden soll; Coffein, selbst in der dreifachen Dosis des in der Brechdosis vorhandenen Coffeins verabreicht, führt nicht zum Erbrechen.

Während bei der Taube die Spanne zwischen brechwirksamer Kaffeedosis (Kaffeefiltrat aus 23–28 g Kaffee pro kg Taube) und letaler Coffeindosis (0,25 Coffein/kg), wie wir oben gesehen haben, sehr gering ist – bemerkenswert ist, daß uns bei den Kaffeefiltratversuchen keine einzige Taube starb, offenbar ist das chlorogensaure Kali-Coffein wegen seines komplexsalzartigen Charakters weniger giftig dadurch, daß es harnfähiger als reines Coffein ist; die zentral angreifende tödliche Krampfdosis wird also nicht so leicht erreicht; wir sind somit in der Lage, Gebhardts (8) Befunde zu bestätigen – liegt sie beim Hunde wesentlich günstiger; die Kaffeebrechdosis entspricht einem Filtrat aus 3,1–5,7 g Kaffee pro kg Hund. Versuche, die Kaffeegrenzbrechdosis für die einzelnen Hunde ausfindig zu machen, wiesen bei der Mehrzahl der Tiere nur einen Fehlerbereich von 10–15 % auf. Eine Gewöhnung an Kaffee oder eine Empfindlichkeitssteigerung im Sinne eines bedingten Reflexes wurde nicht beobachtet. Wie bei der Ermittlung der Brechdosis vorgegangen wurde, sei in Tabelle 1 an einem Beispiel dargestellt; sie betrug in diesem Falle

Tabelle 1. Ermittlung der Grenzbrechdosis eines gerösteten, unbehandelten Columbia-Kaffees bei einem 7 kg schweren Hund.
D. M. = Deutsche Methode; T. M. = Türkische Methode.

Zeitliches Intervall in Tagen	Kaffeemenge in ccm 10:100	Erbrechen nach Min.	Erbrochene Menge %	Erregung nach Min.	Methode
–	450	18	24,4	15	D. M.
Nach 2 Tagen.....	400	25	62,5	10	„ „
„ 5 „	300	—	—	20	„ „
„ 2 „	350	—	—	20	„ „
„ 4 „	400	17	87,5	15	„ „
„ 4 „	360	—	—	20	„ „
„ 4 „	400	35	wenig	20	T. M.
„ 3 „	360	—	—	15	D. M.
„ 20 „	500	14	75	25	„ „
„ 75 „	400	27	75	7	„ „

400 ccm eines Kaffeefiltrates 10 : 100 oder in g Kaffee pro kg Körpergewicht ausgedrückt: 5,71. Diese Dosis wird als Grenzbrechdosis bezeichnet und gleich 100 % gesetzt.

Auch in der Tabelle 5 ist die Streuung der Versuchsergebnisse zwecks Ermittlung der Grenzbrechdosen für unbehandelten Columbia-Kaffee gering; sie beträgt bei den einzelnen Versuchstieren jeweils nur 10 %. Wenn man sich diesen verhältnismäßig geringen Schwankungsbereich betrachtet und bedenkt, daß Steigerung der Konzentration des Kaffeefiltrates unter gleichzeitiger Reduktion der zu verabfolgenden Flüssigkeitsmenge keinen wesentlichen Einfluß auf die Brechwirksamkeit hat, gewinnt man leicht den Eindruck, daß es sich bei den brechenerregenden Substanzen um hochwirksame Stoffe handeln müßte, die daher nur in an sich kleinen Mengen im Kaffee vorzukommen brauchen, und daß der Brecheffekt vielleicht nicht so sehr durch die Konzentration dieses Stoffes, als vielmehr durch seine absolute Menge im Kaffee hervorgerufen werde, man also hier von einer Dosenfrage sprechen könnte; wir glauben daher berechtigt zu sein, die Brechdosis in g Kaffee pro kg Körpergewicht angeben zu dürfen.

In Tabelle 2 sind für 17 kleine, meist mischrassige Hunde die ermittelten Grenzbrechdosen für unbehandelten, gerösteten Columbia-Kaffee in einer Konzentration von 10 : 100 angegeben. Der mittlere Zeitwert für den Eintritt des Brecheffektes liegt bei 35 Minuten. Man könnte daher geneigt sein anzunehmen, daß das Erbrechen erst nach erfolgter Resorption eines nicht zu bestimmenden Anteiles des Kaffeegetränkes eintrete. Gegen

Tabelle 2. Brechversuche mit geröstetem, unbehandeltem Columbia-Kaffee bei Hunden.

Nr.	Alter in Jahren	Gewicht in kg	Verabfolgte Menge in ccm	Brechdosis in g Kaffee pro kg	Erregung nach Min.	Erbrechen nach Min.	Menge des Erbrochenen in %
1	2	7,0	400	5,71	13	26	75
2	1/2	8,5	400	4,70	20	unbek.	50
3	1/2	4,7	200	4,25	—	90	10
4	1/2	5,6	200	3,58	7	23	90
5	3/4	8,8	330	3,75	8	35	50
6	1/2	9,0	350	3,89	20	35	60
7	1 1/4	15,0	600	4,00	15	45	70
8	3/4	8,0	400	5,00	—	32	75
9	1 1/2	5,1	250	4,90	15	23	80
10	2	12,0	500	4,16	15	20	70
12	3	7,4	315	4,26	18	20	50
14	3/4	11,7	360	3,08	25	30	80
15	1 1/2	5,0	250	5,00	15	22	60
16	1 1/2	5,1	225	4,41	15	60	40
17	2	6,5	342	5,26	30	31	40
18	4	9,8	306	3,12	18	40	30
19	3	10,0	306	3,06	11	22	40
			Mittelwerte:	4,25	16,3	34,6	57

diese Auffassung spricht erstens, daß der obige Zeitmittelwert für die Grenzbrechdosis angegeben ist, so daß das Tier sich erst spät zum Erbrechen entschließen wird, zweitens, daß eine ausgeprägte Nausea, in der bekanntlich, wie wir auch schon oben gesehen haben, eine deutliche Resorptionshemmung zu beobachten ist, im Mittel bereits nach 16 Minuten auftritt, und schließlich drittens, daß bei einer Steigerung der Brechdosis um nur 10 % das Erbrechen schon nach etwa 15 Minuten und die Nausea etwa nach 10 Minuten auftritt. Wir vermuten, ohne es allerdings bis jetzt bewiesen zu haben, daß die brechwirksamen Substanzen im Kaffee einen lokalen Angriffspunkt an den emeticosensiblen Nervenendigungen der Magenschleimhaut haben, daß sie also auf indirektem Wege den Brechakt auslösen. Zur Erhärtung dieser Annahme wird es nötig sein, brechwirksame Extrakte in der erforderlichen Reinheit aus dem Kaffee herzustellen, um sie dann auf ihre Wirksamkeit nach subcutaner oder intravenöser Injektion zu prüfen.

Vergleich verschiedener Kaffeesorten.

Die einzelnen in den Handel kommenden Kaffeesorten unterscheiden sich je nach Standort und Klima hinsichtlich ihres Aromas, ihrer Würze und ihres Säuregehaltes ganz wesentlich. Wir werden daher auch von vornherein erwarten, daß sie in bezug auf ihre Bekömmlichkeit bzw. ihre Brechwirkung Unterschiede zeigen werden. In Tabelle 3 wollen wir den unbehandelten, gerösteten Columbia-Kaffee, dessen Grenzbrechdosis mit 100 % bezeichnet werden soll, mit dem stark säurehaltigen Costarica- und dem milden Menado-Kaffee vergleichen. Bei 3 von 5 Hunden liegt die Brechdosis für Costarica-Kaffee um 20 % niedriger, bei den anderen 2 wird sie in derselben Höhe wie für den Columbia-Kaffee gefunden. Andere Kaffeesorten, wie z. B. der außerordentlich widerstandsfähige, geschmacklich nicht beliebte Robusta-Kaffee, für die Einzelzahlen nicht angeführt werden sollen, zeigen gleichfalls keine wesentlichen Abweichungen. Nur für den Menado-Kaffee, der in Lagerhäusern, deren Sonnenseite offen ist, mindestens ein Jahr, meistens länger gelagert wird, so daß die Kaffeebohnen eine eigentümlich gelblich-braune Färbung annehmen, die von manchen Kaffeesachverständigen als Zeichen einer stattgehabten Fermentation gewertet wird, ließ sich zeigen, daß die Brechwirkung bei der Mehrzahl der Tiere deutlich geringer war (s. auch Abb. 1 auf S. 383).

Vergleich verschiedener Kaffeezubereitungsmethoden und Vorbehandlungsmethoden der Kaffeebohne zum Zwecke einer größeren Bekömmlichkeit.

Die ersten bedeutenderen Versuche zur Kultivierung der Kaffeepflanzen bestanden in Kreuzungen zwischen Coffea arabica und Coffea liberica. Die auf diese Weise erhaltenen Hybriden erwiesen sich aber als wenig widerstandsfähig gegen Pilzbefall, was wieder weitere Veredlungs-

Tabelle 3. Kaffeebrechdosisschwankungen beim Hund bei Verwendung verschiedener Kaffeesorten.

Nr.	Gewicht kg	Columbia-Kaffee				Menado-Kaffee					Costarica-Kaffee				
		Konzentration des Kaffeefiltrats	Menge ccm	g Kaffee pro kg	Erbrechen nach Min.	Konzentration des Kaffeefiltrats	Menge ccm	g Kaffee pro kg	Erbrechen nach Min.	Brechdosis % *	Konzentration des Kaffeefiltrats	Menge ccm	g Kaffee pro kg	Erbrechen nach Min.	Brechdosis % *
10	13	100/1000	450	—	—	110/1000	510	4,32	—	112	80/1000	500	3,08	—	80
		100/1000	500	3,85	22	150/1000	525	**6,06**	47	**158**	100/1000	500	**3,85**	20	**100**
12	7,4	100/1000	350		—	110/1000	360	5,35	—	126	80/1000	315	3,41	15	80
		100/1000	315	4,25	20	150/1000	360	**7,30**	—	**172**	80/1000	350	**3,79**	10	**89**
14	11,7	100/1000	324	—	—	—	—	—	—	—	80/1000	360	2,46	—	80
		100/1000	360	3,08	30	110/1000	375	**3,53**	18	**126**	100/1000	360	**3,08**	22	**100**
16	5,1	100/1000	203	—	—	110/1000	250	5,39	—	122	80/1000	225	3,53	—	80
		100/1000	225	4,41	60	150/1000	275	**8,10**	32	**184**	80/1000	250	**3,92**	80	**89**
17	6,5	100/1000	325	—	—	—	—	—	—	—	80/1000	312	3,84	—	71,5
		100/1000	342	5,26	31	110/1000	342	**5,79**	15	**110**	80/1000	342	**4,21**	52	**80**
	Mittelwerte der Grenzbrechdosen:			**4,17**				**6,15**		**150**			**3,77**		**91,6**

* Die für die Ermittlung der Grenzbrechdosis benötigte Kaffeefiltratmenge eines Columbia-Kaffees 10 : 100 wird gleich 100 % Brechdosis gesetzt.

versuche zur Folge hatte. Man bemühte sich aber nicht nur um die Zucht der Kaffeepflanzen, sondern auch um eine Veredelung der fertigen Kaffeefrucht, wie wir es für den Menado-Kaffee schon kennengelernt haben, dies offenbar nur deshalb, weil der Kaffee, der eines der begehrtesten Genußmittel darstellt, nicht allen Menschen in gleichem Maße bekommt. Man hat diesem Übelstande durch verschiedene Arten der Kaffeegetränkzubereitung abzuhelfen versucht.

I. Deutsche und Türkische Methode der Getränkebereitung. Bedeutung des Milchzusatzes.

Man rühmt der Kaffeezubereitung nach der sogenannten Türkischen Methode (T. M.), wo der staubfein gemahlene Kaffee mit Wasser und Zucker kalt angesetzt und rasch zum Aufkochen gebracht wird, im Gegensatz zur Getränkherstellung nach der sogenannten Deutschen Methode (D. M.), wo mittelfein gemahlener Kaffee auf ein Papierfilter geschüttet, an-

schließend kochendes Wasser darüber gegossen und durchfiltriert wird, eine bessere Bekömmlichkeit nach. Wir stellten auch Versuche mit einem nach der T. M. hergestellten Kaffeeaufguß an, aber nur in der Form, daß wir den Hunden die überstehende sämige Flüssigkeit durch die Schlundsonde verabfolgten. Trotzdem wir in diesen Versuchen nicht dieselbe Extraktmenge wie bei Verabfolgung von Kaffeefiltrat nach der D. M. gaben [Holste und Miholić (9)], konnten wir eine wesentlich bessere Verträglichkeit nicht feststellen; wohl aber hatten wir in einigen Versuchen den Eindruck, als ob die für das Erbrechen benötigte Kaffeemenge höher läge, aber nie um mehr als 30 %. Ob die vielgerühmte und nach unserer Meinung auch zu Recht bestehende gute Bekömmlichkeit des nach der T. M. hergestellten Kaffeegetränkes auf dem geringeren Gehalt an Extraktivstoffen der überstehenden Lösung beruht, da der staubfeine Kaffeegrund durch seine adsorptiven Kräfte mehr wasserlösliche Stoffe adsorbiert hält im Gegensatz zum nach der D. M. bereiteten Kaffeefiltrat, wo der Kaffeegrund gleichsam ausgewaschen wird, oder ob die Schwebeteilchen im Kaffeegetränk nach der T. M. gewisse Stoffe adsorptiv gebunden halten und sie erst allmählich im Magen abgeben, so daß es zu einer verzögerten Resorption kommt bzw. die Schleimhaut reizende Konzentration nicht so leicht erreicht wird — diese Erklärung könnte in entsprechender Weise besonders für den Fall zutreffen, wo der Kaffeegrund mitgetrunken wird —, oder ob schließlich irgendwelche, z. B. gerbstoffhaltige Verbindungen bei der D. M. ausgewaschen werden, ist schwer zu entscheiden. Der Extraktgehalt des Kaffeeaufgusses nach der T. M. nähert sich dem Extraktgehalt des Kaffeefiltrats nach der D. M. um so mehr, je mehr Wasser für die gleiche Kaffeemenge genommen wird.

An dieser Stelle möchten wir auch noch kurz die Bedeutung von Milchzusatz für die Kaffeebekömmlichkeit besprechen. Nach O. Eichler (2) wirkt Milch als Mucilaginosum reizmildernd; nach Miller und Mitarbeitern (10) hemmt Milchzusatz zum Kaffee die Magensekretion; Starkenstein und E. Winternitz (11) finden nach Milchzusatz eine Resorptionsverschlechterung speziell für das Coffein und führen dies auf die groben Flockungen des Coffein-Gerbstoffkomplexes mit den Milcheiweißkörpern zurück.

II. Waschverfahren.

Vor längerer Zeit schon machte man die äußerlichen Verunreinigungen der Kaffeebohnen für die Unverträglichkeit verantwortlich und unterwarf den Rohkaffee vor der Röstung einem Waschprozeß; erwähnenswert ist hier das Waschverfahren von Thum (12), wo der Rohkaffee in Wasser von 65—70° wenige Minuten mit Bürsten gründlich gereinigt wird, wodurch eine weitgehende Entfernung von Schmutz und Kaffeefetten erreicht wird. Nach E. Harnack (3) soll der so vorbehandelte, geröstete Kaffee bekömmlicher sein; Harnack macht die Röstprodukte und Kaffeefette für die Unverträglichkeit verantwortlich.

III. Entcoffeinisierung.

Danach beschuldigte man im Kaffee den am leichtesten faßbaren und wegen seiner pharmakologischen Wirksamkeit am längsten bekannten Stoff, das Coffein. Da die Komplexverbindung des Coffeins mit der Chlorogensäure sehr locker ist, ist es möglich, durch leichtes Quellen des Kaffees in Wasserdampfatmosphäre das Coffein für den Übertritt in organische Lösungsmittel zu mobilisieren (1).

Um nun festzustellen, ob Coffeinentzug die Bekömmlichkeit durch Verminderung der Brechwirkung steigere, gaben wir unseren Hunden entcoffeinisierten Kaffee (Kaffee Hag), entsprechend wie den unbehandelten Columbia-Kaffee, in einer Konzentration von 10 : 100. Einige der Versuche seien in Tabelle 4 angeführt. Weder in bezug auf die Brechdosis noch auf den zeitlichen Eintritt der Nausea und des Erbrechens * waren Unterschiede zu bemerken. Dies steht auch im Einklang mit den Erfahrungen einiger magenempfindlicher Personen unseres Bekanntenkreises, die Kaffee Hag genau so wenig wie gewöhnlichen Kaffee vertragen. Auch in der Literatur finden sich Stimmen (4), die über eine schlechte Verträglichkeit coffeinfreien Kaffees bei Patienten berichten. Daß Tauben ebenfalls auf Kaffee Hag hin erbrachen, wurde schon erwähnt.

Tabelle 4. Brechversuche mit Columbia-Kaffee und Kaffee Hag bei Hunden.

Nr.	Gewicht in kg	Brechdosis von Columbia-Kaffee in g/kg	Zeitpunkt des Erbrechens in Min.	Brechdosis von Kaffee Hag in g/kg	Zeitpunkt des Erbrechens in Min.
1	7,0	5,71	21	5,87	12
8	8,0	5,00	32	5,00	8
9	5,1	4,90	23	4,90	25
10	12,0	4,16	20	4,16	15
	Mittelwerte:	4,94	24	4,98	15

IV. Lendrich-Verfahren.

Einen anderen Weg zur Kaffeeveredelung schlug die Firma J. J. Darboven, Hamburg, ein; gemäß dem Lendrich-Verfahren (13) wird der Rohkaffee einer kombinierten Wasserdampfdruckbehandlung, und zwar für mindestens eine Stunde, bei 1—3 Atm. Überdruck unterworfen; nach Trocknung der Bohnen wird die Röstung angeschlossen. Das Verfahren wurde mit der Behauptung eingeführt, daß durch Spaltung der Chlorogensäure in Chinasäure und Kaffeesäure ein bekömmlicheres Kaffeegetränk erzielt werden könne. Dieser behandelte Kaffee kommt unter der Bezeichnung „Idee-Kaffee“ in den Handel. Als auffällig ist hier zu verzeichnen, daß die gut bekömmlichen Menado-Kaffeebohnen im ungerösteten Zu-

* Der aus Tabelle 4 ersichtliche frühere Eintritt des Erbrechens ist wohl nur ein Zufallsbefund.

stand mit den Idee-Bohnen nach der Wasserdampfdruckbehandlung die hellbraune Farbe gemeinsam haben. Durch die Behandlung ändert sich übrigens der Coffeingehalt der Kaffeebohnen nicht, oder nur ganz unwesentlich. Um eventuell vorhandene Unterschiede in der Brechwirkung besonders deutlich sehen zu können, beschlossen wir, die Behandlung des Rohkaffees mit gespanntem Wasserdampf zu übertreiben. Wir erhöhten den Druck auf 3 - 3.5 Atm. und ließen die Bohnen 5 Stunden lang im Autoklaven im Wasserdampf. Nach Trocknung der Bohnen, die eine tiefdunkelbraune Färbung zeigten, rösteten wir; den so erhaltenen Kaffee wollen wir „Über-Idee-Kaffee" nennen; der Geschmack war ungewöhnlich mild, aber etwas fade, während der Idee-Kaffee bekanntermaßen von anderem Kaffee in geschmacklicher Hinsicht nur durch seine Milde zu unterscheiden ist. Der Extraktverlust betrug beim durch diese forcierte Behandlung hergestellten Kaffee höchstens 20 %. Wir bemühten uns nun unter Beachtung aller Vorsichtsmaßregeln die Frage, ob die Brechwirkung von behandeltem Kaffee geringer ist, somit also die Bekömmlichkeit eine Erhöhung erfährt, zu prüfen, zumal letzteres reklamemäßig ausgenutzt wird. In Tabelle 5 sind die Versuche ausführlich zusammengestellt. Daß die Reizwirkung eines Stoffes, der noch dazu ein Genußmittel darstellt, bei Verwendung höchster Dosen nach noch so sorgfältiger Vorbehandlung völlig verschwinden wird - es müßte denn sein, auf Kosten des Geschmacks, wie z. B. nach der forcierten Wasserdampfdruckbehandlung - -, kann nicht erwartet werden.

Als überraschendes Ergebnis, das wir immer wieder bestätigen konnten, fanden wir, daß die Brechwirkung des nach dem Lendrich-Verfahren behandelten Kaffees im Tierexperiment sehr viel geringer war als die unbehandelten Kaffees; auch das Auftreten der Nausea wurde viel seltener beobachtet, meist erst nach sehr hohen Dosen. Auch von zahlreichen Bekannten wurde uns eine größere Bekömmlichkeit des nach diesem Verfahren hergestellten Kaffees bestätigt.

a) Versuche an Hunden.

Die Fehlergrenze für die Ermittelung der Grenzbrechdosen beträgt 10 %, wie aus der Tabelle 5 ersichtlich ist. Für die Auslösung des Brechreflexes ist eine Erhöhung der Dosis für behandelten und überbehandelten Kaffee von fast 100 % erforderlich. Wir wollen nicht behaupten, daß wir für den behandelten Kaffee immer gerade die Grenzbrechdosis bestimmt haben. Ein Maß für eventuelle Überdosierung bietet, wie wir schon oben gesehen haben, der Zeitpunkt des Erbrechens; bei Hund 14 z. B. ist für den behandelten Kaffee offenbar überdosiert worden, für den überbehandelten dagegen wohl gerade der Grenzwert bestimmt worden. Für jeden Hund sind auch mehrere Versuche angegeben, wo offensichtlich unterdosiert wurde, d. h. wo der Schwellenwert für das Erbrechen nicht erreicht wurde. Nausea wurde beim „Über-Idee-Kaffee" fast nie beobachtet, ebenso

Tabelle 5.

Vergleichende Brechversuche an Hunden mit unbehandeltem, behandeltem und überbehandeltem Kaffee (D. M.).

Nr.	Gewicht kg	Unbehandelter Columbia-Kaffee: Konzentration des Kaffeefiltrats	Menge ccm	g Kaffee pro kg	Erbrechen nach Min.	Behandelter Columbia-Kaffee: Konzentration des Kaffeefiltrats	Menge ccm	g Kaffee pro kg	Erbrechen nach Min.	Brechdosis in % *	Überbehandelter Columbia-Kaffee: Konzentration des Kaffeefiltrats	Menge ccm	g Kaffee pro kg	Erbrechen nach Min.	Brechdosis in % *
8**	7,2	100/1000	350	**4,86**	**24**	—	—	—	—	—	125/1000	350	6,08	0	125
		100/1000	315	4,38	0	—	—	—	—		125/1000	400	6,95	0	143
			—	—	—	—	—	—	—	—	150/1000	400	**8,33**	**55**	**171**
10	13,0	100/1000	500	**3,85**	**22**	150/1000	550	5,96	0	155	150/1000	550	5,96	0	155
		100/1000	450	3,46	0	200/1000	500	**7,70**	**25**	**200**	150/1000	600	**6,92**	**25**	**180**
		100/1000	525	4,04	11	130/1000	430	4,31	0	112†	—	—	—		—
		200/1000	250	3,85	Nausea	150/1000	500	5,77	30	150†	—	—	—	—	—
12	7,4	100/1000	315	**4,25**	**20**	125/1000	325	5,50	0	129	125/1000	350	5,91	0	139
		100/1000	350	4,73	30	150/1000	360	**7,30**	**22**	**171**	125/1000	400	6,75	0	159
		100/1000	283	3,83	0	125/1000	360	6,08	0	143†	150/1000	450	**9,12**	**12**	**214**
		200/1000	158	4,25	5	150/1000	315	6,39	60	150†	—	—	—	—	—
14	11,7	100/1000	360	**3,08**	**10**	150/1000	400	5,13	0	167	150/1000	425	5,45	0	177
		100/1000	400	3,42	30	200/1000	420	**7,18**	**8**	**233**	150/1000	450	5,77	0	188
		100/1000	324	2,77	0	150/1000	360	4,62	0	150†	200/1000	430	**7,35**	**85**	**239**
		200/1000	180	3,08	14	200/1000	360	6,16	17	200†	—	—	—	—	—
16	5,1	100/1000	225	**4,41**	**60**	150/1000	250	7,35	0	167	150/1000	250	7,35	0	167
		100/1000	250	4,90	30	200/1000	275	**10,80**	**32**	**244**	150/1000	340	**10,00**	**75**	**227**
		100/1000	203	3,98	0	150/1000	275	8,08	0	183†	—	—	—	—	
		200/1000	113	4,41	Nausea	200/1000	250	9,80	31	222†	—	—	—	—	—
17	6,5	100/1000	342	**5,26**	**31**	125/1000	360	6,93	0	132	150/1000	450	10,40	0	197
		100/1000	380	5,85	10	150/1000	342	7,90	18	150	200/1000	420	**12,90**	**16**	**246**
		100/1000	325	5,00	0	130/1000	342	**6,85**	**24**	**130**	—	—	—	—	—
		200/1000	171	5,26	22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	9,8	100/1000	306	**3,12**	**40**	125/1000	380	4,85	0	155	125/1000	375	4,79	0	153
		100/1000	340	3,47	12	130/1000	400	**5,31**	**32**	**170**	150/1000	400	**6,12**	**25**	**196**
		100/1000	289	2,95	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	10,0	100/1000	306	**3,06**	**22**	125/1000	380	4,75	0	155	125/1000	375	4,69	0	153
		100/1000	340	3,40	16	130/1000	400	**5,20**	**35**	**170**	150/1000	400	**6,00**	**55**	**196**
		100/1000	289	2,89	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Mittelwerte der Grenzbrechdosen:		**3,98**	**28,6**			**7,18**	**25,4**	**188**			**8,35**	**43,5**	**208**

* Brechdosis für unbehandelten Columbia-Kaffee sind gleich 100% Brechdosis zu setzen. ** Brechdosis 1½ Jahre später.

fehlten besondere Erregungszustände; nach etwa 1—2 Stunden trat Unruhe auf, die aber meist von geringerem Grade als nach anderem coffeinhaltigen Kaffee war. Es ist schließlich noch als wichtig festzustellen, daß eine Überbehandlung des Kaffees nicht notwendig ist, um die Brechwirkung zu verringern. Es war für uns nur außerordentlich interessant zu finden, daß durch eine forcierte Wasserdampfdruckbehandlung die brechwirksamen Substanzen fast zum Verschwinden gebracht werden können.

Der Übersichtlichkeit halber sei es uns erlaubt, die Veränderungen in der Brechwirksamkeit von Kaffeefiltraten, auch im Vergleich mit dem

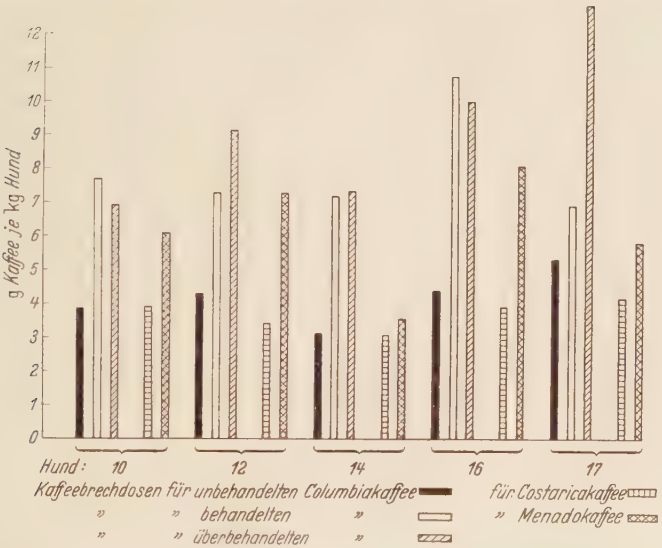


Abb. 1.

Costarica- und dem Menado-Kaffee, noch einmal graphisch zur Anschauung zu bringen (Abb. 1).

Eine derartig weitgehende Zurückdrängung der Möglichkeit einer Magenreizung durch behandelten Kaffee berechtigt uns zu der Behauptung, daß der gemäß dem Lendrich-Verfahren behandelte Kaffee nicht nur wesentlich bekömmlicher als alle anderen bisher bekannten Kaffeesorten und Arten der Kaffeebehandlung oder -zubereitung sein muß, sondern daß der Genuß von solchem Kaffee auch von den sogenannten Kaffeeempfindlichen und insbesondere auch von kranken Menschen — in den üblichen Mengen genossen — reizlos vertragen werden kann, abgesehen natürlich von der Möglichkeit subjektiver Beeinflussung.

b) Versuche an Tauben.

Nachdem wir bei den Hunden das Nachlassen der brechenerregenden Wirkung von Kaffee nach vorangegangener Wasserdampfdruckbehandlung

festgestellt hatten, wollten wir die Verifizierbarkeit dieses Effektes nun auch bei den Tauben zeigen. Wir behandelten rohe entcoffeinisierte Kaffeebohnen bei 130° unter Überdruck 4 Stunden lang im Autoklaven. Einen Teil dieser Bohnen rösteten wir, ohne sie vorher behandelt zu haben, um für die Taubenversuche vergleichbare Ausgangsbrechdosen zu erhalten. Wir wählten für diese Versuche den coffeinfreien Kaffee aus Gründen, die schon früher dargelegt wurden (s. S. 372), zumal zu erwarten war, daß eine wesentliche Erhöhung der zu verabfolgenden Kaffeemenge für die Erzielung des Brecheffektes notwendig sein würde, und daß der Coffeingehalt bei Anstellung dieser Versuche stören würde. Die Tauben erwiesen sich gegen diesen Kaffee empfindlicher, als früher gegen den unbehandelten coffeinhaltigen Columbia-Kaffee, was z. T. wohl durch die Jahreszeit zu erklären war, zum anderen Teil aber auch durch die Eigenart des verwandten Kaffees bedingt sein konnte. Manche Tauben erbrachen auf fast jede verabreichte Kaffeemenge, so daß diese von den Versuchen ausgeschaltet werden mußten; dies lag wohl daran, daß bei diesen Tieren der physiologische Brechreflex zu stark ausgeprägt war, zumal die Versuche im Frühjahr ausgeführt wurden. Wegen dieser Schwierigkeiten bauten wir die Taubenversuche auch nicht weiter aus.

Einige unserer zahlreichen Versuche haben wir in Tabelle 6 zusammengestellt. Man sieht auch hier sehr deutlich, daß die Brechwirkung von behandeltem Kaffee ganz erheblich geringer war, bei Taube 6 und 8 trotz hoher Dosierung sogar völlig zum Verschwinden gebracht werden konnte.

c) Dämpfung der Kaffeebohnen. Untersuchung des Kondenswassers.

Um das beim Lendrich-Verfahren sich bildende Kondenswasser auf seinen Gehalt an brechwirksamen Substanzen untersuchen zu können, veränderten wir das Verfahren, da unsere Autoklavenwandung aus Kupfer bestand, in der Richtung, daß wir die Rohbohnen einer 6—8stündigen Wasserdampfbehandlung bei Atmosphärendruck in einem mit Emaille ausgekleideten Dämpfapparat aussetzten. Die so erhaltene grünliche Brühe — die grüne Farbe ist nach K. Täufel (14) auf gelöste Chlorogensäure zurückzuführen, die sich durch Luftoxydation grün färbt, wobei die sogenannte „Viridinsäure“ entsteht — wurde volumenmäßig der ermittelten Brechdosis angepaßt und etwa in der fünffachen Menge, die erwartungsgemäß zum Erbrechen hätte führen müssen, den Hunden verabreicht, wobei aber der Gesamtgewichtsverlust der Bohne beim Rösten in Höhe von 16—21 % noch berücksichtigt werden mußte. Bei allen Tieren war heftige Unruhe zu beobachten; 50 % von ihnen erbrachen. Es ist natürlich nach diesen Versuchen noch nicht sicher, ob tatsächlich die brechwirksamen Substanzen des gerösteten Kaffees hier wirksam gewesen sind, oder ob dies nicht Stoffe waren, die auch beim Röstprozeß zerstört werden und

Tabelle 6. Erbrechen der Tauben auf coffeinfreien unbehandelten gerösteten und überbehandelten gerösteten Kaffee.

	Unbehandelt					Überbehandelt					
Nr.	D. M.	Verabfolgte Menge in ccm	g Kaffee pro kg**	Erbrechen nach Min.	Häufigkeit	D. M.	Verabfolgte Menge in ccm	g Kaffee pro kg**	Erbrechen nach Min.	Häufigkeit	Brechdosen in %*
1	15/100	25	9,4	0	—	30/100	25	18,8	0	—	167
	15/100	30	11,3	37	3×	40/100	40	40,0	24	4×	354
2	15/100	35	13,1	0	—	30 100	35	26,2	0	—	175
	15/100	40	15,0	85	2×	40/100	40	40,0	10	2×	267
3	15/100	30	11,3	84	1×	40/100	25	18,8	72	1×	167
	15/100	30	11,3	50	2×	—	—	—	—	—	—
4	15/100	35	13,1	65	1×	30/100	35	26,2	0	—	200
	15/100	35	13,1	43	2×	40/100	45	45,0	10	2×	344
5	15/100	25	9,4	0	—	30/100	25	18,8	0	—	167
	15/100	30	11,3	70	1×	30/100	35	26,2	32	3×	232
6	15/100	25	9,4	0	—	30/100	25	18,8	0	—	167
	15/100	30	11,3	35	1×	40/100	45	45,0	0	—	400
7	15/100	35	13,1	44	1×	30/100	30	22,5	43	3×	172
	15/100	35	13,1	55	3×	—	—	—	—	—	—
8	15/100	40	15,0	0	—	30/100	35	26,2	0	—	116
	20/100	45	22,5	45	2×	40/100	52	52,0	0	—	231

* Die für unbehandelten Kaffee ermittelten Brechdosen sind gleich 100% zu setzen.
** Im Mittel 400 g schwer.

hierbei entweichen: schließlich können auch Abbauprodukte einiger vorher im Kaffee vorhanden gewesener Substanzen, die beim Röstprozeß nie entstehen, die Brechwirkung des Dämpfwassers bedingt haben.

Röstete man nun die so behandelten Kaffeebohnen und verabfolgte sie als Kaffeefiltrat den Hunden, so ließ sich in zahlreichen Versuchen, auf deren Wiedergabe im einzelnen verzichtet werden soll, feststellen, daß die Brechwirkung der Kaffeebohnen nach dem vorangegangenen Dämpfprozeß genau so gering war wie die des nach dem Lendrich-Verfahren behandelten Kaffees. Allerdings sei aber hinzugefügt, daß der Extraktverlust nach der Dämpfung deutlich größer war als der nach dem Lendrich-Verfahren.

Versuche zur Isolierung der brechwirksamen Substanzen im Kaffeefiltrat.

Unsere Untersuchungen zur Auffindung der brechwirksamen Stoffe im Kaffee haben bis jetzt noch nicht zu einem abschließenden Ergebnis geführt. Wegen des Kriegsausbruchs haben wir sie unterbrechen müssen; zur gegebenen Zeit werden wir sie wieder fortsetzen. Die bis jetzt erzielten Ergebnisse seien im folgenden kurz mitgeteilt.

Zur Klärung der Frage, ob die brechwirksamen Substanzen bereits in der Rohbohne vorhanden seien oder erst während des Röstprozesses entstehen, verabfolgten wir den Hunden Rohkaffeeauszüge (hergestellt analog den Kaffeefiltraten) in Höhe der ermittelten Brechdosis; in keinem Falle trat Erbrechen auf. Allerdings sind im Kondenswasser, das nach stundenlanger Dämpfung roher Kaffeebohnen zurückbleibt, wie auf S. 384 näher ausgeführt, brechwirksame Stoffe in sehr geringer Menge, da nur sehr hohe Gaben eine emetische Wirkung zeigten, nachweisbar. Dieser Befund läßt, wie schon diskutiert, die Frage offen, ob nicht auch schon bei der Wasserdampfbehandlung brechwirksame Substanzen entstehen, wie wir es für den Röstprozeß annehmen möchten.

Nachdem nun klargestellt war, daß die zum Brecheffekt führenden Substanzen im wesentlichen im fertigen Kaffeegetränk vorhanden sind, haben wir zwecks Einengung der in Frage kommenden Stoffe Äther-Extraktionsversuche mit Hilfe des Kutscher-Steudelschen Extraktionsapparates angestellt. Dabei zeigte es sich nun, daß sowohl bei natursaurer wie kongosaurer (durch Zusatz verdünnter HCl) Reaktion eines Kaffeefiltrates 10 : 100 die brechwirksamen Stoffe zum großen Teil in den Äther übergingen, was sich im Hundeversuch exakt nachweisen ließ. Der im Vakuum entätherte und auf dem Wasserbad eingeengte Kaffeefiltratrückstand war emetisch unwirksam. Der bei alkalischer Reaktion des Kaffeefiltrates gewonnene Ätherextrakt führte trotz seines hohen Coffeingehaltes, in hoher Dosierung gegeben, nicht zum Erbrechen; dagegen blieb, wie zu erwarten, der neutralisierte Rückstand brechwirksam.

Als Ergebnis dieser Versuche ist festzustellen, daß die brechwirksamen Substanzen durch Säuren und Alkalien nicht zerstört werden, daß sie aber nur aus saurem Kaffeefiltrat in den Äther übergehen, woraus wir schließen möchten, daß unter den fraglichen Substanzen möglicherweise Stoffe vom Charakter schwacher organischer Säuren sein könnten.

Diskussion.

Aus den im vorstehenden geschilderten Untersuchungen geht hervor, daß es gelungen ist, im Tierexperiment eine Handhabe zu finden, die Frage der Bekömmlichkeit von Kaffeegetränken zu prüfen, indem die zu verabfolgende Dosis soweit gesteigert wird, bis Erbrechen auftritt. Bei der Prüfung der verschiedenen Kaffeebehandlungsmethoden ergab sich als überraschender, immer wieder reproduzierbarer Befund, daß nach dem Lendrich-Verfahren behandelter Kaffee (im Handel als „Idee-Kaffee" erhältlich) erheblich an Brechwirkung verliert, was u. E. einer Steigerung der Bekömmlichkeit gleichkommt. Welche Veränderungen in der Zusammensetzung dieses behandelten Kaffees hierbei maßgebenden Anteil haben, ist heute noch nicht mit Bestimmtheit zu sagen. Soviel kann aber schon jetzt als sicher gelten, daß der Coffeingehalt des Kaffees für das Zustande-

kommen des Kaffeeerbrechens keine Rolle spielt. Auch Veränderungen des Chlorogensäuregehaltes in Richtung einer Spaltung in Chinasäure und Kaffeesäure [K. Lendrich (13)] oder einer weitergehenden Zerstörung [Hoepfner (15), Griebel (16)] sind sicher nicht für die Verminderung der Brechwirkung verantwortlich zu machen. Die meisten Anzeichen sprechen bis jetzt für die Annahme, daß die Röstprodukte im Kaffee die magenschleimhautreizende Wirkung ausüben. Die Zichorie, ein alkaloid- und chlorogensäurefreies Naturprodukt [V. Graefe (17)], das fast ausschließlich aus Röstprodukten besteht, wirkt in hohen Dosen stark brechenerregend, während der keine Röstprodukte enthaltende Tee auch in hohen Dosen emetisch unwirksam ist. Aus den vorliegenden Analysen der flüchtigen Röstöle (18) von geröstetem Kaffee und gerösteter Zichorie geht hervor, daß in den Röstprodukten zahlreiche magenschleimhautreizende Stoffe, wie Aldehyde, Furfuralkohol, Furfurol u. a., vorkommen (die brechenerregende Wirkung der genannten Stoffe wird durch von uns angestellte Versuche bestätigt): in dem Röstöl des brechunwirksamen Malzkaffees sind die letzteren Stoffe in weit geringerer Menge enthalten.

Zusammenfassung.

Die wesentlichen, im Laufe unserer Untersuchungen gemachten Feststellungen seien im folgenden noch einmal zusammengestellt:

1. Im Kaffeegetränk sind brechwirksame Substanzen tierexperimentell nachweisbar. Die für die Auslösung des Brechaktes benötigte Kaffeefiltratdosis läßt sich für den Hund mit einem Fehlerbereich von 10 –15 % ermitteln; sie beträgt im Mittel 42.5 ccm eines Kaffeefiltrates aus 100 g geröstetem, unbehandeltem Columbia-Kaffee auf 1 Liter kochendes Wasser pro kg Hund.

2. Die einzelnen unbehandelten Kaffeesorten zeigen geringe, aber immerhin faßbare Unterschiede in der Brechwirkung; Kaffeesorten mit hohem Säuregehalt, wie z. B. Costarica-Kaffee, zeigen eine erhöhte Brechwirksamkeit; Sorten von ausgesprochen mildem Charakter, wie z. B. der Menado-Kaffee, erfordern für die Auslösung des Brecheffektes eine Erhöhung der zu verabfolgenden Dosis.

3. Coffeinfreier Kaffee, wie Kaffee Hag oder Da Capo-Kaffee, unterscheidet sich weder durch die für das Erbrechen benötigte Kaffeedosis noch durch den zeitlichen Eintritt des Erbrechens und der Nausea von gewöhnlichem Columbia-Kaffee.

4. Kaffee, der vor der Röstung dem Lendrich-Verfahren, d. h. einer kombinierten Druckwasserdampfbehandlung unterworfen wird, verliert etwa 50 % an Brechwirkung, d. h. um den Brechakt auszulösen, muß die zu verabfolgende Dosis dieses Kaffees verdoppelt werden. Hieraus kann man auf eine größere Bekömmlichkeit des nach dem Lendrich-

Verfahren behandelten Kaffees schließen. Lange Zeit und bei hohem Wasserdampfdruck durchgeführte Behandlung hebt die Brechwirksamkeit nahezu auf.

5. Bei der Taube, die jahreszeitliche Schwankungen in der Brechfähigkeit zeigt, liegt die Kaffeebrechdosis pro kg Taube etwa fünfmal höher als beim Hund und ist sehr nahe bei der tödlichen Coffeindosis gelegen. Die Möglichkeit eines Coffeineffektes wird durch Versuche mit coffeinfreiem Kaffee ausgeschlossen: Kaffee Hag ruft bei der Taube in derselben Dosierung Erbrechen hervor, so daß die gleichen Stoffe, die beim Hunde Erbrechen auslösen, auch hier wirksam sind. Coffeinfreier Da Capo-Kaffee, der vor der Röstung einer forcierten Druckwasserdampfbehandlung ausgesetzt wurde, zeigte bei den Tauben eine so verringerte Brechwirkung, daß in einigen Fällen der Brecheffekt nicht mehr auszulösen war.

6. Versuche zur Isolierung der brechwirksamen Substanzen im Kaffee haben ergeben, daß bei saurer Extraktion die brechenerregenden Stoffe in den Äther übergehen, nicht dagegen bei alkalischer Reaktion. Die Bedeutung der Röstprodukte für das Zustandekommen des Kaffeeerbrechens wird diskutiert.

Literatur.

(1) Deutsche Pharmakolog. Ges.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 118 (1938). — (2) Eichler, O.: Kaffee u. Coffein, Berlin, Verlag Jul. Springer, 1938. — (3) Harnack, E.: Münch. med. Wschr. 1911, S. 187. — (4) Lickint, F.: Med. Klin. **1931**, S. 387. — (5) Mellinger: Pflügers Arch. **24**, 232, 1881. — (6) Stepp, W.: Arch. ges. Pathol. u. Pharmakol. **190**, 150 (1938). — (7) „Der Kaffee", Her. Kaiserl. Gesundheitsamt, Berlin 1903. — (8) Gebhardt: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 696 (1939). — (9) Holste u. Miholić: Arch. Hyg. (D.) **113**, 108—111 (1934). — (10) Miller, J. R., O. Bergeim, M. E. Rehfuß u. P. B. Hawk: Am. Journ. Physiol. **52**, 28 (1920). — (11) Starkenstein u. E. Winternitz: Schweiz. med. Wschr. **1937**, S. 454. — (12) Thum: Internat. Hyg. Ausstell. z. Dresden 1911. — (13) Lendrich, K.: DRP. 576514/1927, zit. n. K. Täufel: Hdb. d. Lebensmittelchemie, Bd. VI, S. 27. — (14) Täufel, K.: Hdb. d. Lebensmittelchemie, Bd. VI, 1934. — (15) Hoepfner, W.: Chem.-Ztg. **56** (1932); Z. f. Untersuch. d. Leb. **66**, 238 (1933). — (16) Griebel: Chem.-Ztg. **57**, 353 (1933); Z. f. Untersuch. d. Leb. **67**, 452 (1934). — (17) Graefe, V.: Biochem. Z. **68**, 10 (1915). — (18) Trillich, H.: Rösten u. Röstwaren, 2. Auflage, S. 432. München, Verlag Heller, 1934.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. Main.

Die Abhängigkeit der Acetylcholinwirkung am isolierten Meerschweinchenuterus von Konzentration und Reaktionstemperatur*.

Von

Walther Laubender und **Bodo Mertz.**

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Oktober 1939.)

Einleitung.

In drei vorhergehenden Arbeiten [1,2,3] war der Versuch gemacht worden, den Wirkungsmechanismus von Pharmaca, die teils den glatten, teils den quergestreiften Muskel erregen, dadurch aufzuklären, daß die quantitative Abhängigkeit des erzielten Effektes von Giftkonzentration und Reaktionstemperatur ermittelt wurde. Gesetzmäßige Resultate, die einer rechnerischen Auswertung zugänglich waren, ergaben sich am isolierten Meerschweinchenuterus vor allem bei Orasthin und Histamin, am quergestreiften Froschmuskel bei Acetylcholin, Nikotin und zum Teil auch bei Coniin. Die Deutung der gewonnenen Ergebnisse war schwierig, da nicht mit Sicherheit entschieden werden konnte, ob die aufgefundenen Gesetzmäßigkeiten auf die Reaktion zwischen Pharmakon und Substrat oder auf die im Organ selbst liegende Reaktionskette zu beziehen waren.

Um eine brauchbare Grundlage für die Beurteilung zu schaffen, erschienen unter anderen zwei Wege gangbar. Erstens konnte die Abhängigkeit des erzielten Effektes von Reizgröße und Temperatur bei Anwendung eines andersartigen, z. B. des elektrischen Reizes studiert werden; von diesem Vorgehen, mit dem begonnen ist, soll in der vorliegenden Arbeit nicht die Rede sein. Zweitens konnte versucht werden, die Wirkungsweise ein und desselben Stoffes an verschiedenen Testobjekten festzustellen.

Da Acetylcholin am quergestreiften Muskel zu Ergebnissen geführt hatte, die in der Wirkungsweise dieses Mittels einen der Katalyse des normalen Geschehens nahekommenden Vorgang vermuten ließen, und da

* Dissertation (B. Mertz) der Med. Fakultät der Universität Frankfurt a. M. 1938. Zugleich IV. Mitteilung einer Arbeitenfolge über die Prinzipien pharmakologischer Wirkung. Die I. Mitteilung wurde im Arch. ges. Physiol. **229**, 672 (1932), die II. Mitteilung in Naunyn-Schmiedebergs Arch. **174**, 223 (1933), die III. Mitteilung ebenda **182**, 401 (1936) veröffentlicht.

[1] Lipschitz, W., u. W. Hsing: Arch. ges. Physiol. **229**, 672 (1932).
[2] Lipschitz, W., u. F. Klar: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **174**, 223 (1933).
[3] Laubender, W., u. H. Kolb: Ebenda **182**, 401 (1936).

bekannt ist [4], daß Acetylcholin den isolierten Uterus zu erregen vermag, stellten wir uns in der vorliegenden Arbeit die Aufgabe, nunmehr auch die Abhängigkeit der Acetylcholinwirkung von Konzentration und Reaktionstemperatur am isolierten Meerschweinchenuterus quantitativ zu verfolgen.

Es ist zweckmäßig, wie in einer der früheren Arbeiten [3] auseinandergesetzt wurde, derartige Untersuchungen nach zwei Richtungen hin durchzuführen. Daher wurde sowohl die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Acetylcholin und Uterus als auch der jeweils erreichbare Gleichgewichtszustand bei verschiedener Konzentration und Temperatur geprüft. Als Maßstab für die Reaktionsgeschwindigkeit wurde nicht nur die Latenzzeit, d. h. diejenige Zeit, die vom Zusatz des Pharmakons bis zum Beginn der Muskelkontraktion verstreicht, sondern auch die Kontraktionsgeschwindigkeit herangezogen, d. h. die reziproken Werte der Zeiten, die vom Beginn der Muskelkontraktion bis zur Erreichung eines bestimmten Prozentsatzes an Endhöhe vergehen. Als Maßstab für den Gleichgewichtszustand diente die Kontraktionsgröße des Muskels, d. h. jene Endhöhe, bis zu der der registrierende Uterushebel je nach der angewandten Konzentration und Temperatur emporsteigt.

Methodisches.

In der Versuchsanordnung, in der Technik der Registrierung sowie in der Herstellung und Zusammensetzung der Nährlösung hielten wir uns vollkommen an das von Lipschitz und Hsing [1] bei der Untersuchung von Orasthin und Bariumchlorid sowie von Lipschitz und Klar [2] bei ihren Versuchen mit Histamin und Ergotamin eingehaltene Vorgehen. Die Acetylcholinchloridlösungen wurden hergestellt aus Acetylcholinchlorid Merck; vor jedem Versuch wurden die Acetylcholinchloridlösungen und ihre Verdünnungen frisch bereitet.

Die Belastung der Präparate betrug fast stets 2 g in einer Entfernung von 7 mm vom Drehpunkt in den Versuchen, die nur mit Versuchsnummer oder mit Nummer und dem Buchstaben a bezeichnet sind, oder von 9 mm vom Drehpunkt in den Versuchen, die Versuchsnummer und den Buchstaben b tragen. In der ersten Versuchsreihe betrug demgemäß das Drehmoment 1,4 g . cm, die Hebelübertragung hatte das Verhältnis 1 : 3,8; in der zweiten Versuchsreihe war das Drehmoment 1,8 g . cm, die Hebelübertragung 1 : 6,5.

Wir benutzten Tiere im Gewicht von 160—200 g; die Grenzen wurden also noch etwas enger gezogen als in den Versuchen von Lipschitz und Klar [2].

Da die Spitze des registrierenden Uterushebels bei der Kontraktion des Organs der Zeitschreibung bzw. dem Markierhebel voraneilt, mußte zur Projektion der einzelnen Punkte der Kontraktionskurve auf die Fußpunktlinie am Schluß jeden Versuchs ein Kreisbogen gezogen werden, der zum Schnitt mit der Markierlinie gebracht wurde. Sämtliche in den Tabellen angegebene Zeiten sind vom Zusatz des Pharmakons an gemessen. Deshalb wurde zur Ermittlung der Kontraktionsgeschwindigkeit die Latenzzeit jeweils abgezogen. Die Analyse der Erschlaffungskurven erfolgte unter Zugrundelegung der Fußpunktlinie, nicht der Gipfelpunktlinie.

[4] Dale, H. H.: J. of Pharmacol. **6**, 147 (1914); Guggenheim, M.: Biochem. Z. **65**, 189 (1914).

I. Abhängigkeit der Latenzzeit von Konzentration und Temperatur.

Konzentrationen von Acetylcholin, die zu einer mäßigen bis maximalen Kontraktion des Uterus führen, ergeben keine stark ausgeprägte Abhängigkeit der Latenzzeit von der angewandten Pharmakonkonzentration. Trotzdem wurde die immer wieder beobachtete Gesetzmäßigkeit, daß die Latenzzeit mit sinkender Pharmakonkonzentration ansteigt, auch unter der Einwirkung des Acetylcholins auf den Uterus gefunden.

Der Einfluß der Temperatur auf die Latenzzeit unter Acetylcholin, der zunächst in Stufen von 10°, dann aber auch in Stufen von 5° untersucht wurde, drückt sich ebenfalls in einem mäßigen Ansteigen der Latenzzeiten mit sinkender Temperatur aus. Um Fehlschlüsse durch Änderung der Empfindlichkeit des Organs nach Möglichkeit auszuschalten, wurden

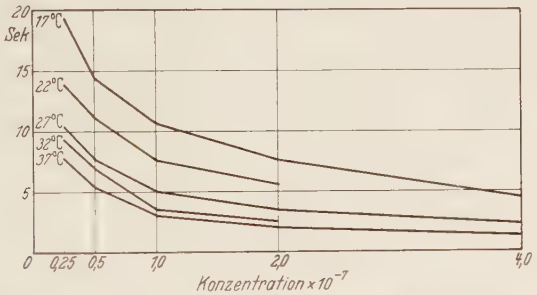


Abb. 1. Abhängigkeit der Latenzzeit des Kontraktionsbeginns unter Azetylcholin von Konzentration und Temperatur. Mittelwerte.

nicht nur einige bei Versuchsbeginn gemachte Prüfungen gelegentlich am Schluß des Versuchs wiederholt, sondern auch die Versuche so geleitet, daß bei einem Teil mit der höheren Temperatur begonnen und zur niedrigeren herabgegangen, bei einem anderen Teil umgekehrt mit der niedrigen begonnen und zur höheren aufgestiegen wurde (s. Tab. 1).

Um einen zahlenmäßigen Ausdruck für das Ansteigen der Latenzzeiten mit sinkender Temperatur zu erhalten, wurden die Temperaturkoeffizienten der Geschwindigkeit des Kontraktionsbeginns im Intervall von 10° bzw. 5° in den einzelnen Versuchen für jede Acetylcholinkonzentration mit Hilfe folgender Formeln errechnet (s. Tab. 2):

$$Q_{10} = \frac{v_{t+10}}{v_t} = \frac{\lambda_t}{\lambda_{t+10}}; \qquad Q_5 = \frac{v_{t+5}}{v_t} = \frac{\lambda_t}{\lambda_{t+5}}.$$

v = Geschwindigkeit; λ = Latenzzeit.

Im Bereich von 37–27° liegen die Werte des Temperaturkoeffizienten Q_{10} fast durchweg zwischen 1,20 und 1,60; der Mittelwert beträgt **1,44.** Zwischen 27 und 17° werden mit wenigen Ausnahmen Werte von 1,50—2,50 gefunden; der Mittelwert beträgt **2,08.**

Tabelle 1. Abhängigkeit der Latenzzeit von Acetylcholinkonzentration und Reaktionstemperatur.
Die Zahlen in Stab 2, 4 und 6 beziehen sich auf die Reihenfolge der einzelnen Zusätze.

Konzentration · 10^{-7}	Zusatz Nr.	Latenzzeit Sek.	Zusatz Nr.	Latenzzeit Sek.	Zusatz Nr.	Latenzzeit Sek.
Meerschweinchen Nr. 75. 190 g. Versuch vom 21. VI. 1937.						
	37°		27°		17°	
0,125	1	∞				
0,25	2	16,0	7	18,0		
0,5	3	7,5				
0,5	16	9,5	8	12,5	12	18,0
1,0	4	3,5				
1,0	17	4,0	9	6,0	13	15,0
2,0	5	2,5				
2,0	18	3,0	10	4,5	14	12,0
4,0	6	2,5	11	3,5	15	8,5
Meerschweinchen Nr. 93. 175 g. Versuch vom 19. VII. 1937.						
	17°		27°		37°	
0,25	1	15,0	6	6,0	11	4,0
0,5	2	12,0	7	4,0	12	3,0
1,0	3	9,0	8	3,0	13	2,0
2,0	4	6,0	9	2,5	14	1,5
4,0	5	3,0	10	2,0	15	1,0
Meerschweinchen Nr. 82. 170 g. Versuch vom 1. VII. 1937.						
	37°		32°		27°	
0,25	1	10,0	6	11,0		
0,25	18	6,0	14	9,0	10	12.0
0,5	2	6,0	7	7,0		
0,5	19	4,5	15	7,0	11	8,0
1,0	3	3,0	8	3,5		
1,0	20	2,5	16	3,5	12	5,0
2,0	4	2,0				
2,0	21	1,0	9	2,5		
2,0	5	1,5	17	2,5	13	3,5
Meerschweinchen Nr. 91. 190 g. Versuch vom 15. VII. 1937.						
	27°		22°		17°	
0,125	1	20,0				
0,25			6	15,0		
0,25	2	11,0	14	16,0	10	21,0
0,5			7	12,0		
0,5	3	9,0	15	12,0	11	18,0
1,0			8	8,5		
1,0	4	6,0	16	8,5	12	12,0
2,0			9	6,0		
2,0	5	4,5	17	6,0	13	9,5

Anmerkung: Vorstehende vier Versuche sind Beispiele für vier verschiedene Versuchsarten. Von jeder dieser Versuchsarten wurden je drei Versuche durchgeführt. Die Veröffentlichung des gesamten Materials mußte aus Gründen der Raumersparnis unterbleiben; dieses kann eingesehen werden im Pharmakologischen Institut Frankfurt a. M.

Tabelle 2. Temperaturkoeffizienten der Geschwindigkeit des Kontraktionsbeginns (Q_{10} bzw. Q_5) unter Acetylcholin.

Konzentration · 10^{-7}	Temperaturspatium 37/27°						Temperaturspatium 27/17°					
	Versuchs-Nr.											
	74	75	88	92	93	94	74	75	88	92	93	94
0,25	1,28	1,12	1,25	1,33	1,50	2,00	2,00		1,30	1,66	2,50	2,25
0,5	1,15	1,47	1,14	1,50	1,33	1,66	1,87	1,44	1,37	1,78	3,00	2,80
1,0	1,37	1,57	1,22	1,50	1,50	1,20	1,82	2,50	1,45	2,00	3,00	3,00
2,0	1,60	1,61	1,33	1,33	1,66	1,25	2,00	2,66	1,50	2,25	2,40	2,40
4,0		1,40		1,50	2,00	2,00		2,43		2,00	1,50	2,00

Konzentration · 10^{-7}	Temperaturspatium 37/32°			Temperaturspatium 32/27°		
	Versuchs-Nr.					
	82	90	89	82	90	89
0,25	1,25	1,04	1,05	1,20	1,14	1,05
0,5	1,32	1,11	1,26	1,14	1,09	1,27
1,0	1,25	1,14	1,32	1,45	1,25	1,51
2,0	1,66	1,30	1,53	1,40	1,33	1,30

Konzentration · 10^{-7}	Temperaturspatium 27/22°			Temperaturspatium 22/17°		
	Versuchs-Nr.					
	83	84	91	83	84	91
0,25		1,24	1,45		1,57	1,31
0,5	1,28	1,44	1,44	1,48	1,53	1,38
1,0	1,36	1,34	1,41	1,32	1,54	1,41
2,0	1,57	1,50	1,33	1,39	1,56	1,58

Die in Intervallen von 5° durchgeführten Versuche bestätigen die im 10°-Intervall erhaltenen Ergebnisse. Es werden für die Temperaturspatien 37—32°, 32—27°, 27—22° und 22—17° im Mittel folgende Q_5-Werte gefunden: 1,27 bzw. 1,26 bzw. 1,41 bzw. 1,44. Multipliziert man die beiden zwischen 37—32° und 32—27° erhaltenen Q_5-Werte, so ergibt sich für das ganze Intervall 37—27° der Q_{10}-Wert **1,60** und bei gleichem Vorgehen für das ganze Intervall 27—17° der Q_{10}-Wert **2,03**. Es ist ersichtlich, daß diese Werte in grundsätzlicher Übereinstimmung mit jenen stehen, die in den Versuchen über das Spatium von 10° erhalten wurden. Man bekommt auch dann gleichsinnige Resultate, wenn man die in Abb. 1 dargestellten mittleren Latenzzeiten zur Grundlage der Berechnung wählt: für das Temperaturintervall 37—27° wird in diesem Falle ein Q_{10}-Wert von **1,53** und für das Intervall 27—17° ein solcher von **2,01** gefunden.

Die Latenzzeit des Acetylcholins am isolierten Uterus hat also einen wesentlich kleineren Temperaturkoeffizienten als die des Orasthins. Für dieses Mittel hatten Lipschitz und Hsing[1] im Temperaturintervall 39—29° beispielsweise einen Q_{10}-Wert von **2,21** und im Intervall von 29—19° einen solchen von **7,49** gefunden (Versuch vom 6. Februar 1931). Dagegen ähnelt der Temperaturkoeffizient der Latenzzeit des Acetylcholins dem des

Histamins, für das von Lipschitz und Klar[2] im Intervall 39—29° beispielsweise ein Q_{10}-Wert **1,60** und im Intervall 29—19° ein solcher von **1,75** gefunden wurde (Versuch vom 14. September 1931).

II. Abhängigkeit der Kontraktionsgeschwindigkeit von Konzentration und Temperatur.

Läßt man bei einer bestimmten Temperatur nacheinander steigende Konzentrationen von Acetylcholin auf den Uterus einwirken, so wächst sowohl die Geschwindigkeit, mit der der Uterus sich kontrahiert, als auch die Endhöhe, bis zu der er sich kontrahiert. Dieses Verhalten wurde grundsätzlich in allen untersuchten Temperaturspatien beobachtet (s. Abb. 2 u. 3 sowie Tabelle 3).

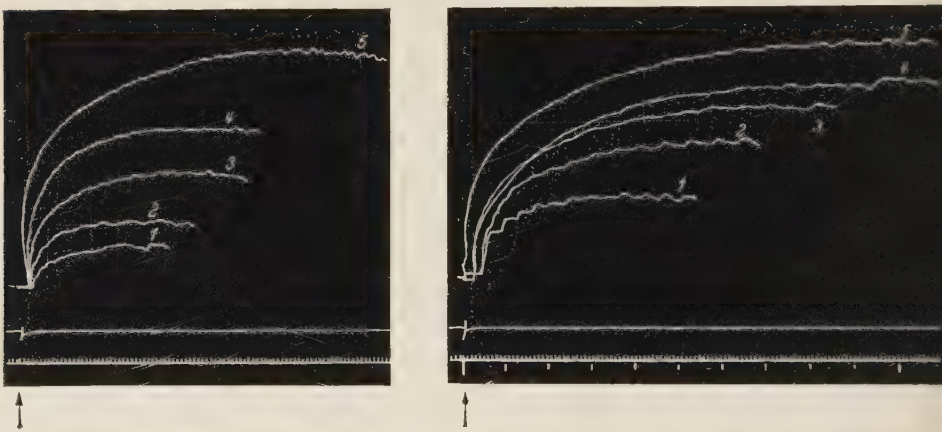


Abb. 2. Abhängigkeit der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Kontraktionsgröße des isolierten Uterus unter Azetylcholin von der Konzentration bei 37° und 27° C.
Meerschweinchen Nr. 54a (10. XII. 1936); Gewicht 165 g. Drehmoment 1,4 g · cm. Hebelübertragung 1: 3,8. Zeitschreibung: jedes Intervall = 6 Sekunden.
▲ Azetylcholinzusatz entsprechend einer Endkonzentration von: $0{,}25 \times 10^{-7}$ (*1*); $0{,}5 \times 10^{-7}$ (*2*); $1{,}0 \cdot 10^{-7}$ (*3*); $2{,}0 \times 10^{-7}$ (*4*); $20{,}0 \cdot 10^{-7}$ (*5*).

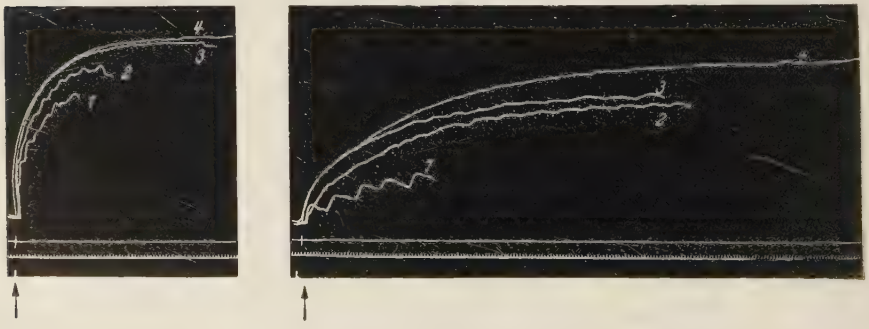


Abb. 3. Abhängigkeit der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Kontraktionsgröße des isolierten Uterus unter Azetylcholin von der Konzentration bei 27° und 17° C.
Meerschweinchen Nr. 44b (17. XI. 1936); Gewicht 175 g. Drehmoment 1,8 g · cm. Hebelübertragung 1: 6,5. Zeitschreibung: jedes Intervall = 10 Sekunden.
▲ Azetylcholinzusatz entsprechend einer Endkonzentration von: $0{,}125 \times 10^{-7}$ (*1*); $0{,}25 \times 10^{-7}$ (*2*); $0{,}5 \times 10^{-7}$ (*3*); $1{,}0 \times 10^{-7}$ (*4*).

Tabelle 3. Abhängigkeit der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Kontraktionsgröße von Acetylcholinkonzentration und Temperatur. t_L = Latenzzeit; t_1, t_2, t_3 und t_4 = denjenigen Zeiten, die bis zur Erreichung von $^1/_4$, $^1/_2$, $^3/_4$ und $^1/_1$ an maximaler Hubhöhe (h_1, h_2, h_3, h_4) verstreichen.

Temperatur in ° C	Konzentration · 10^{-7}	Zusatz Nr.	t_L	t_1	t_2	t_3	t_4	h_1	h_2	h_3	h_4
			in Sek.					in mm			
	Meerschweinchen Nr. 31. 190 g. Versuch vom 26. X. 1936.										
37	0,125	5	6	12	20	23	48	3,25	6,5	9,75	13,0
	0,25	1	6	12	18	26	60	7,25	14,5	21,75	29,0
	0,25	6	12	18	22	26	42	6,0	12,0	18,0	24,0
	0,5	2	6	15	18	25	60	13,5	27,0	40,5	54,0
	1,0	3	9	18	20	23	72	20,0	40,0	60,0	80,0
	2,0	4	10	18	21	24	102	21,5	43,0	64,5	86,0
	20,0	14	15	18	20	23	144	22,5	45,0	67,5	90,0
27	0,125	7	18	24	32	37	57	5,0	10,0	15,0	20,0
	0,25	9	18	36	40	48	72	17,75	35,5	53,25	71,0
	0,25	12	20	39	40	52	96	17,0	34,0	51,0	68,0
	0,5	8	20	36	40	54	96	19,75	39,5	59,25	79,0
	1,0	10	12	24	27	30	198	21,5	43,0	64,5	86,0
	2,0	11	15	24	27	30	222	21,5	43,0	64,5	86,0
	20,0	13	18	24	26	30	390	21,75	43,5	65,25	87,0
	Meerschweinchen Nr. 29. 160 g. Versuch vom 22. X. 1936.										
27	0,125	5	24	30	36	42	102	6,5	13,0	19,5	26,0
	0,25	1	18	24	36	72	330	10,0	20,0	30,0	40,0
	0,25	7	27	30	48	126	318	10,5	21,0	31,5	42,0
	0,5	2	18	24	30	48	216	11,5	23,0	34,5	46,0
	0,5	6	18	24	30	48	180	11,5	23,0	34,5	46,0
	1,0	3	18	24	36	60	300	14,0	28,0	42,0	56,0
	2,0	4	15	23	33	57	360	15,5	31,0	46,5	62,0
	20,0	14	18	27	36	78	480	16,0	32,0	48,0	64,0
37	0,25	8	20	24	26	48	78	4,0	8,0	12,0	16,0
	0,25	12	24	30	36	48	84	4,25	8,5	12,75	17,0
	0,5	9	15	20	36	45	134	10,0	20,0	30,0	40,0
	1,0	10	15	20	24	36	84	14,5	29,0	43,5	58,0
	2,0	11	12	16	21	36	102	15,5	31,0	46,5	62,0
	20,0	13	6	12	18	48	216	16,5	33,0	49,5	66,0
	Meerschweinchen Nr. 43 b. 180 g. Versuch vom 16. XI. 1936.										
27	0,25	1		15	48	120	300	10,0	20,0	30,0	40,0
	0,5	2		25	54	150	528	12,5	25,0	37,5	50,0
	1,0	3		33	66	138	642	13,5	27,0	40,5	54,0
17	0,25	4		30	96	162	570	5,25	10,5	15,75	21,0
	0,5	5		48	120	240	840	9,25	18,5	27,75	37,0
	Meerschweinchen Nr. 44 a. 175 g. Versuch vom 17. XI. 1936.										
17	0,125	3	24	39	54	126	240	1,75	3,5	5,25	7,0
	0,25	1	15	39	72	210	498	4,0	8,0	12,0	16,0
	0,5	2	18	36	75	162	702	6,25	12,5	18,75	25,0
	1,0	4	18	42	84	258	840	7,75	15,5	23,25	31,0
27	0,125	5	12	27	36	78	84	3,5	7,0	10,5	14,0
	0,25	6	10	24	33	72	156	8,5	17,0	25,5	34,0
	0,5	7	9	21	33	66	252	9,75	19,5	29,25	39,0
	1,0	8	6	15	33	72	354	10,25	20,5	30,75	41,0

Tabelle 3 (Fortsetzung).

Temperatur in ° C	Konzentration · 10^{-7}	Zusatz Nr.	t_L	t_1	t_2	t_3	t_4	h_1	h_2	h_3	h_4
			in Sek.					in mm			
Meerschweinchen Nr. 54 b. 165 g. Versuch vom 10. XII. 1936.											
37	0,25	1	9	24	48	72	84	0,5	1,0	1,5	2,0
	0,5	2	12	24	33	57	108	2,0	4,0	6,0	8,0
	1,0	3	12	27	48	99	228	5,0	10,0	15,0	20,0
	2,0	4	9	24	48	88	246	7,5	15,0	22,5	30,0
	20,0	13	24	42	69	176	516	21,5	43,0	64,5	86,0
32	0,25	5	30	42	78	84	108	1,0	2,0	3,0	4,0
	0,5	6	30	42	60	78	138	3,25	6,5	9,75	13,0
	1,0	7	30	42	72	126	300	5,5	11,0	16,5	22,0
	2,0	8	33	54	78	138	420	9,5	19,0	28,5	38,0
27	0,25	9	33	51	84	90	126	3,0	6,0	9,0	12,0
	0,5	10	36	51	72	103	300	5 0	10,0	15,0	20,0
	1,0	11	36	51	90	160	456	9,5	19,0	28,5	38,0
	2,0	12	33	60	108	180	720	13,0	26,0	39,0	52,0
	20,0	14	21	42	72	206	900	23,5	47,0	70,5	94,0
Meerschweinchen Nr. 46 b. 185 g. Versuch vom 20. XI. 1936.											
27	0,5	1	15	30	84	135	300	5,0	10,0	15,0	20,0
	1,0	2	12	27	78	130	660	6,5	13,0	19,5	26,0
	2,0	3	12	27	78	180	720	10,0	20,0	30,0	40,0
22	0,5	4	21	42	142	270	684	4,0	8,0	12,0	16,0
	1,0	5	21	42	102	220	960	4,5	9,0	13,5	18,0
	2,0	6	21	42	96	216	1020	8,75	17,5	26,25	35,0

Anmerkung: 12 weitere Versuche dieser Art konnten aus Gründen der Raumersparnis nicht veröffentlicht werden. Das Material kann eingesehen werden im Pharmakologischen Institut Frankfurt a. M.

Der Einfluß der Temperaturänderung auf die Kontraktionsgeschwindigkeit und die Kontraktionsgröße wurde ähnlich wie bei den Latenzzeiten in Intervallen von 10^0, dann aber auch in Intervallen von 5^0 studiert. Als Maßstab für die Kontraktionsgeschwindigkeit konnten dabei die reziproken Werte der Zeiten benutzt werden, die vom Beginn der Kontraktion bis zur Erreichung von 25, 50 und 75 % der Endhöhe verstreichen: Viertel-, Halb-, Dreiviertelwertszeiten. Um auch hier Fehlschlüssen durch temperaturbedingte Änderung der Empfindlichkeit des Organs zu entgehen, wurde bei einem Teil der Versuche zuerst die höhere Temperaturstufe geprüft und zur niedrigeren herabgestiegen, bei dem anderen Teil umgekehrt vorgegangen.

Es ergab sich übereinstimmend, daß die Kontraktionsgeschwindigkeit des Organs, in guter Abhängigkeit von den gewählten Temperaturstufen, um so kleiner wird, je niedriger die angewandte Temperatur ist. Die Abnahme der Kontraktionsgeschwindigkeit mit sinkender Temperatur kommt immer in gleicher Weise zum Ausdruck, gleichgültig, ob man die Änderung der Viertel-, Halb- oder Dreiviertelwertszeiten zur Beurteilung heranzieht.

Das Kleinerwerden der Kontraktionsgeschwindigkeit mit sinkender Temperatur läßt sich ähnlich wie bei den Latenzzeiten zahlenmäßig ausdrücken, wenn man den Temperaturkoeffizienten der Kontraktionsgeschwindigkeit unter den einzelnen Acetylcholinkonzentrationen aus den Versuchen berechnet. Diese Berechnung wurde zunächst für die Halbwertszeiten, dann auch für die Viertel- und Dreiviertelwertszeiten durchgeführt, und zwar sowohl bei den im 10°-Intervall wie bei den im 5°-Intervall angestellten Versuchen (s. Tab. 4).

Tabelle 4. Temperaturkoeffizienten der Kontraktionsgeschwindigkeit (Q_{10} bzw. Q_5) unter Acetylcholin, bezogen auf die Zeiten, die bis zur Erreichung von $^1/_4$, $^1/_2$ und $^3/_4$ an maximaler Hubhöhe verstreichen.

Temperaturspatium 37/27° C

Konzentration · 10^{-7}	Versuchs-Nr. 28			30			31			34			29			33		
	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$
0,125							1,00	1,00	1,12									
0,25	3,00	3,33	2,57	2,00	1,81	2,00	3,00	1,91	1,76	2,50	2,91	1,27	1,50	2,11	1,93			
0,5	1,22	1,13	1,24	2,70	1,78	2,13	1,77	1,67	1,78	1,41	1,13	1,11	1,20	1,09	1,00	1,25	1,61	1,74
1,0	1,13	1,36	1,40	1,33	1,00	1,00	1,33	1,36	1,28	1,50	2,00	1,80	1,20	2,00	2,22	1,50	1,98	1,59
2,0	1,22	1,27	1,74	1,50	1,11	1,47	1,13	1,09	1,07	1,00	1,66	1,86	2,00	2,00	1,75	1,81	1,58	1,77
20,0	1,22	1,36	1,56	1,00	1,33	2,50	2,00	1,60	1,50	1,50	1,25	1,50	1,50	1,50	1,43	1,75	1,51	1,71

Temperaturspatium 27/17° C

Konzentration · 10^{-7}	Versuchs-Nr. 43 a			43 b			44 a			44 b		
	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$
0,125							1,00	1,25	1,54	1,29	2,16	1,89
0,25	2,57	1,58	1,60	2,00	2,00	1,35	1,71	2,52	3,11	2,33	2,46	2,70
0,5	2,37	2,31	1,91	1,96	2,22	1,60	1,38	2,37	2,52	2,10	2,35	2,03
1,0							2,66	2,44	3,63	2,75	2,57	2,47

Temperaturspatium 37/32° C | Temperaturspatium 32/27° C

Konzentration · 10^{-7}	Versuchs-Nr. 54 a			54 b			54 a			54 b			50			47		
	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$
0,25	1,25	1,22	1,05	1,25	1,23	1,17	1,20	1,06	1,13	1,20	1,06	1,06	1,25	1,00	1,01	1,17	1,06	1,23
0,5	1,00	1,11	1,22	1,00	1,42	1,07	1,25	1,44	1,72	1,25	1,20	1,37	1,50	1,44	1,41	1,33	1,53	1,53
1,0	1,33	1,23	1,24	1,25	1,11	1,11	1,25	1,40	1,26	1,40	1,38	1,18	1,50	1,56	1,41	1,33	1,60	1,51
2,0	1,33	1,22	1,63	1,40	1,16	1,34	1,50	1,57	1,45	1,28	1,75	1,40	1,20	1,41	1,59			
20,0	1,25	1,30	1,45	1,17	1,13	1,21												

Temperaturspatium 27/22° C

Konzentration · 10^{-7}	Versuchs-Nr. 45 a			45 b			46 a			46 b		
	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^3/_4$
0,25	1,06	1,18	1,10	1,00	1,32	1,39						
0,5	1,50	1,40	1,53	1,25	1,44	1,46	1,25	1,64	1,32	1,40	1,75	2,07
1,0	1,50	1,63	1,71	1,67	1,57	1,59	1,50	1,53	1,62	1,40	1,23	1,59
2,0	1,77	1,63	1,44	1,67	1,61	1,33	1,40	1,04	1,33	1,40	1,14	1,08

Den Halbwertszeiten kommt im Temperaturspatium 37 -27° ein Temperaturkoeffizient von **1,62**, zwischen 27—17° ein solcher von **2,16** im Mittel zu. Ganz ähnliche Werte werden für die Temperaturkoeffizienten der beiden anderen Zeitgrößen erhalten: Zwischen 37—27° beträgt der Temperaturkoeffizient der Viertelwertszeit im Mittel **1,61**, der der Dreiviertelwertszeit **1,64**; zwischen 27—17° sind die entsprechenden Werte **2,04** bzw. **2,05**. Man kann also schließen, daß der durch die Halbwertszeiten ermittelte Temperaturkoeffizient der Kontraktionsgeschwindigkeit ohne große Abweichung für den ganzen Ablauf der Kontraktionskurve gilt.

Die Aufteilung der 10°-Intervalle in 5°-Intervalle führte zu einer Bestätigung der soeben geschilderten Ergebnisse: Zwischen 37—32° beträgt der Temperaturkoeffizient der Halbwertszeit im Mittel 1,22; zwischen 32 -27° 1,36; durch Multiplikation beider Zahlen erhält man den für das 10°-Intervall gültigen Wert von **1,66**. Im Intervall 27—22° beträgt der Temperaturkoeffizient der Halbwertszeit 1,43. Versuche für das letzte Temperaturspatium 22—17° wurden aus äußeren Gründen nicht mehr durchgeführt. Trotzdem läßt sich durch Quadrieren des im Intervall 27 -22° erhaltenen Koeffizienten der für 27—17° gültige Wert annähernd berechnen: man erhält **2,04**. Ähnliche Resultate ergeben die Viertel- und Dreiviertelwertszeiten: bei ersteren erhält man für Q_{37-32} 1,22, für Q_{32-27} 1,31, für Q_{27-22} 1,40; bei letzteren für Q_{37-32} 1,25, für Q_{32-27} 1,36, für Q_{27-22} 1,47. Man kann daraus bei den Viertelwertszeiten für das Intervall 37 -27° auf einen Temperaturkoeffizienten von **1,60** und für das Intervall 27 -17° auf einen solchen von **1,96** schließen. Die entsprechenden Werte aus den Dreiviertelwertszeiten betragen 1,70 bzw. 2,16.

Der Temperaturkoeffizient der Kontraktionsgeschwindigkeit unter Acetylcholin stimmt somit völlig überein mit dem Temperaturkoeffizienten seiner Latenzzeit. Daraus ist zu folgern, daß in der Latenzzeit und in der Kontraktionsgeschwindigkeit grundsätzlich dasselbe Geschehen zum Ausdruck kommt. Ein ähnlicher Schluß läßt sich aus den Befunden von Lipschitz und Hsing[1] für Orasthin ziehen. Auch hier war die Temperaturabhängigkeit der Latenzzeit und Kontraktionsgeschwindigkeit die gleiche: allerdings bewegten sich beide in einem wesentlich höheren Zahlenbereich. Für Histamin hatten Lipschitz und Klar[2] dagegen über ein Divergieren des Temperaturkoeffizienten der Latenzzeit und der Kontraktionsgeschwindigkeit berichtet. Histamin würde damit eine Sonderstellung unter den drei untersuchten Mitteln einnehmen, insofern als bei diesem Mittel Latenzzeit und Kontraktionsgeschwindigkeit nicht der Ausdruck für dasselbe Geschehen wären. Aus den von diesen Autoren veröffentlichten Versuchsergebnissen allerdings ist die behauptete Divergenz nicht klar ersichtlich.

III. Abhängigkeit der Kontraktionsgröße von Konzentration und Temperatur.

1.

Die im vorhergehenden Abschnitt mitgeteilten Versuche, in denen steigende Konzentrationen von Acetylcholin nacheinander zugesetzt und jedesmal wieder weggewaschen wurden (Auswaschversuche), lassen nicht nur eine Aussage über die Abhängigkeit der Kontraktionsgeschwindigkeit, sondern auch eine Aussage über die Abhängigkeit der Kontraktionsgröße von der angewandten Konzentration und Temperatur zu.

Mit wachsender Acetylcholinkonzentration steigt die Hubhöhe an. Aber dieses Ansteigen erfolgt keineswegs proportional mit der Konzentration; vielmehr wird der Zuwachs an Hubhöhe relativ immer kleiner. Die Konzentrationswirkungsbeziehung des Acetylcholins am isolierten Meerschweinchenuterus wird also ähnlich wie am quergestreiften Muskel durch eine sich stark abflachende Kurve dargestellt.

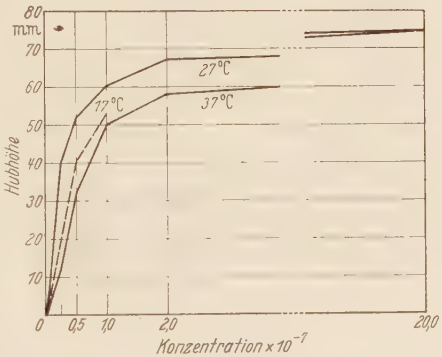


Abb. 4. Abhängigkeit der Kontraktionsgröße des Uterus unter Azetylcholin von Konzentration und Temperatur. Mittelwerte.

Der Temperatureinfluß auf die Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins soll zunächst für das Intervall 37—27° und für das Intervall 27—17° erörtert werden. In sämtlichen im Temperaturspatium 37—27° angestellten Versuchen führten gleiche Konzentrationen von Acetylcholin bei 27° zu größeren Hubhöhen als bei 37°. Durch Erniedrigung der Temperatur auf 17° wurde dagegen kein weiteres Ansteigen der Hubhöhen gesehen; vielmehr blieben die unter 17° beobachteten Hubhöhen wieder beträchtlich hinter den bei 27° erreichten zurück. Die Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins stellt also bei 27° eine Art Maximum dar, von dem aus die Hubhöhen mit fallender und steigender Temperatur sich erniedrigen (s. Abb. 4).

Die Richtigkeit dieser Beobachtung konnte erhärtet werden durch die im 5°-Intervall ausgeführten Versuche. Bei 32° wurden etwas höhere Hubhöhen als bei 37°, und bei 27° wieder etwas höhere als bei 32° beobachtet. Umgekehrt wurde bei weiterer Senkung der Temperatur von 27° auf 22° stets ein Zurückbleiben der Hubhöhen gesehen. Die Verschiebung, welche die Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins durch Tem-

peraturänderung erfährt, läßt sich analysieren, wenn man ihrem Ablauf die Formel

$$K \cdot x = \frac{y}{100 - y}$$

(x = Pharmakonkonzentration, y = Wirkung in % der Maximalen) oder die durch Umformung aus dieser Gleichung herleitbare Formel

$$xb - ya - xy = 0$$

Tabelle 5. a- und b-Werte unter Acetylcholin, berechnet aus der Beziehung von Pharmakonkonzentration und Hubhöhe nach der Formel $xb - ya - xy = 0$ mit Hilfe zweier Wertepaare (x_1, y_1 und x_2, y_2).

Versuch Nr.	Datum 1936	Temperatur °C	x_1	y_1	x_2	y_2	a	b
28	21. X.	37	8	52,0	32	71,0	4,44	80,16
		27	8	60,0	32	71,0	2,28	78,79
30	23. X.	37	8	40,0	32	71,0	11,10	90,20
		27	8	59,0	32	78,0	3,78	87,0
29	22. X.	37	8	40,0	32	62,0	7,18	75,9
		27	8	46,0	32	62,0	4,19	70,08
33	28. X.	37	8	12,0	32	30,0	32,0	60,0
		27	8	17,0	32	38,0	22,4	64,6
31	26. X.	37	8	54,0	32	86,0	7,88	107,19
		27	8	79,0	32	86,0	0,97	88,70
34	29. X.	37	8	36,0	32	64,0	11,0	80,23
		27	8	56,0	32	72.0	3,37	79,59
44a	17. XI.	27	4	34,0	16	41,0	1,18	44,03
		17	4	16,0	16	31,0	7,03	44,12
44b	17. XI.	27	4	82,0	16	97,0	1,04	103,32
		17	4	48,0	16	80,0	4,58	100,08
54a	10. XII.	37	8	16,0	32	36,0	23,57	63,14
		32	8	22,0	32	46,0	18,28	72,27
54b	10. XII.	37	8	8,0	32	30,0	76,0	94,50
		32	8	13,0	32	38,0	57,14	105,85
50a	4. XII.	32	8	27,0	32	48,0	12,86	70,40
		27	8	30,0	32	52,0	10,35	70,10
47	23. XI.	32	4	32,0	16	48,0	3,70	61,60
		27	4	36,0	16	52.0	2,79	61,11
54a	10. XII.	32	8	22,0	32	46,0	18,28	72,27
		27	8	30,0	32	48,0	8,0	60,0
54b	10. XII.	32	8	13,0	32	38,0	57,14	105,85
		27	8	20,0	32	52,0	36,43	127,72
45a	19. XI.	27	8	66,0	32	75,0	1,92	81,84
		22	8	54,0	32	65,0	2,40	70,20
45b	19. XI.	27	8	76,0	32	83,0	1,01	85,59
		22	8	55,0	32	74,0	4,16	84,35
46a	20. XI.	27	8	34,0	32	46,0	4,27	52,15
		22	8	16,0	32	32,0	16,0	48,0
46b	20. XI.	27	8	20,0	32	40,0	16,0	60,0
		22	8	16,0	32	35,0	20,96	57,92

zugrunde legt. Daß diese Formel die Beziehung zwischen Pharmakonkonzentration und Wirkung weitgehend getreu wiederzugeben vermag, ist für mehrere Pharmaka und verschiedene Testobjekte festgestellt worden. Für Acetylcholin hat Clark [5] ihre Gültigkeit bei der Wirkung auf den isolierten Ventrikel und den Rectus abdominis des Frosches gezeigt. Auch für die Wirkung auf den isolierten Meerschweinchenuterus kann ihre Brauchbarkeit aus den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Zahlen erschlossen werden.

Da nach dieser Formel der Verlauf der Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins bei einer bestimmten Temperatur vollständig durch die beiden Konstanten a und b definiert ist, muß eine Verschiebung derselben, wie sie bei Temperaturänderung stattfindet, in einer Änderung dieser beiden Konstanten zum Ausdruck kommen. Es wurden deshalb aus fast sämtlichen Versuchen mit Hilfe obiger Formel die a- und b-Werte für die verschiedenen Temperaturstufen berechnet (s. Tab. 5).

Im Intervall 37—27° nahm die Konstante a mit sinkender Temperatur ab, im Intervall 27—17° wurde sie dagegen mit sinkender Temperatur größer. Die im 5°-Intervall angestellten Versuche brachten eine Bestätigung dieser Ergebnisse. Sowohl beim Heruntergehen von 37° auf 32° wie beim Heruntergehen von 32° auf 27° nimmt a stets ab, und zwar entsprechend der kleineren Temperaturdifferenz in geringerem Maße. Bei weiterem Heruntergehen von 27° auf 22° nimmt a dagegen wieder zu, ganz in Übereinstimmung mit den im 10°-Intervall gemachten Erfahrungen. Im Gegensatz zu der sehr ausgeprägten Änderung der Konstante a bei Temperaturwechsel behält b fast stets den gleichen Wert. Die Änderungen des errechneten b-Wertes sind meist so gering, daß sie ohne weiteres als durch Streuung der Versuchsresultate bedingt gelten können. Rechnung und Experiment stimmen darin überein, daß die maximale Hubhöhe des Muskels bei jeder Temperaturstufe erreicht werden kann, wenn man nur hinreichend große Konzentrationen von Acetylcholin verwendet. Für die Verschiebung der Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins bei Temperaturänderung ist ausschließlich die Veränderung der Konstante a verantwortlich zu machen.

2.

Die im vorstehenden mitgeteilte Tatsache, daß bei Steigerung der Temperatur von 17—37° die Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins nicht fortschreitend in einer bestimmten Richtung verschoben wird, sondern von 17—27° sich erhöht, dann aber von 27° auf 37° wieder absinkt, steht im auffälligen Gegensatz zu den Versuchsergebnissen von Lipschitz und Hsing [1] bei Orasthin. Unter der Einwirkung dieses Mittels wurde ein stetiges Ansteigen der Konzentrationswirkungskurve mit Temperaturerhöhung gefunden. Der Befund schien so bemerkenswert, daß wir versuchten, seine Richtigkeit noch auf anderem Wege zu beweisen.

[5] Clark, A. J.: J. Physiol. (Brit.) **61**, 530 (1926).

Anstatt nacheinander steigende Konzentrationen von Acetylcholin auf das Organ einwirken zu lassen und diese jedesmal wieder wegzuwaschen, führten wir in einer größeren Versuchsreihe dem Uterus immer höhere Konzentrationen von Acetylcholin in der Weise zu, daß in dem Augenblick, in dem der Uterus die Endhöhe an Kontraktion erreicht bzw. überschritten hatte, jeweils die nächsthöhere Konzentrationsstufe geschaffen wurde (Aufsetzversuche). Es gelingt nämlich auch durch diese Methode, die Abhängigkeit von Pharmakonkonzentration und Wirkung zu ermitteln,

Tabelle 6. Abhängigkeit der Hubhöhe (in mm) von Acetylcholinkonzentration und Temperatur (Aufsetzversuche).

Temperatur: 37° C.

Konzentration · 10^{-7}	Nr. 61a	Nr. 61b	Nr. 62a	Nr. 62b
0,125	6,0	2,0		
0,25	16,0	6,0	12,0	22,0
0,5	23,0	10,0	17,0	31,0
1,0	30,0	18,0	25,0	42,0
2,0	38,0	34,0	36,0	62,0
4,0	48,0	48,0	44,0	92,0
0,125				
0,25			13,0	18,0
20,0	60,0	90,0	58,0	116,0

Temperatur: 32° C.

Konzentration · 10^{-7}	Nr. 61a	Nr. 61b	Nr. 62a	Nr. 62b	Nr. 59a	Nr. 59b	Nr. 60a	Nr. 60b
0,25	18,0	8,0	17,0	26,0	20,0	12,0	27,0	40,0
0,5	30,0	16,0	25,0	44,0	31,0	26,0	38,0	70,0
1,0	37,0	26,0	36,0	80,0	36,0	36,0	47,0	88,0
2,0	44,0	40,0	46,0	100,0	42,0	50,0	57,0	108,0
4,0	52,0	64,0	54,0	114,0	48,0	76,0	64,0	128,0
0,125	10,0	5,0					16,0	16,0
0,25			15,0		14,0	16,0		
0,5				54,0				
20,0	62,0	88,0	62,0	120,0			68,0	134,0

Temperatur: 27° C.

Konzentration · 10^{-7}	Nr. 57a	Nr. 57b	Nr. 58a	Nr. 58b	Nr. 59a	Nr. 59b	Nr. 60a	Nr. 60b
0,063	5,0							
0,125	14,0	8,0						
0,25	26,0	24,0	9,0	5,0	23,0	26,0	44,0	64,0
0,5	34,0	44,0	15,0	11,0	33,0	42,0	50,0	84,0
1,0	44,0	66,0	23,0	29,0	44,0	76,0	56,0	100,0
2,0	52,0	90,0	32,0	40,0	49,0	86,0	60,0	114,0
4,0			42,0	55,0	52,0	92,0	66,0	138,0
0,063	6,0							
0,125		8,0					28,0	46,0
0,25			9,0	6,0	26,0			
0,5						54,0		
20,0	54,0	104,0	54,0	80,0			68,0	130,0

Tabelle 6 (Fortsetzung).

Temperatur: 22° C.

Konzentration · 10⁻⁷	Nr. 57a	Nr. 57b	Nr. 58a	Nr. 58b
0,25	18,0	20,0	4,0	3,0
0,5	22,0	28,0	9,0	6,0
1,0	32,0	48,0	20,0	24,0
2,0	40,0	66,0	30,0	37,0
4,0	46,0	82,0	40,0	50,0
0,125	8,0			
0,25			4,0	
0,5		32,0		6,0
20,0	50,0	98,0	48,0	72,0

Temperatur: 27° C.

Konzentration · 10⁻⁷	Nr. 55a	Nr. 55b	Nr. 56a	Nr. 56b
0,125	18,0	34,0	18,0	36,0
0,25	44,0	58,0	32,0	56,0
0,5	58,0	86,0	44,0	74,0
1,0	68,0	106,0	52,0	86,0
2,0	72,0	120,0	59,0	94,0
0,125		36,0	12,0	26,0
0,25	40,0			
20,0	76,0	130,0	62,0	96,0

Temperatur: 17° C.

Konzentration · 10⁻⁷	Nr. 55a	Nr. 55b	Nr. 56a	Nr. 56b
0,25	26,0	30,0	10,0	14,0
0,5	36,0	38,0	18,0	30,0
1,0	48,0	53,0	30,0	48,0
2,0	58,0	76,0	42,0	62,0
4,0	64,0	86,0	52,0	80,0
0,125	14,0			
0,25		30,0	8,0	8,0
20,0	70,0	120,0	54,0	82,0

Anmerkung zu Tabelle 6: Die mit gleicher Nummer und gleichem Buchstaben versehenen Versuche wurden am gleichen Horn durchgeführt. Die mit a und b versehenen Versuche sind an den beiden Hörnern desselben Tieres durchgeführt.

wie Langley [6] für das Nikotin am isolierten Froschmuskel und Lipschitz und Klar [2] für Orasthin und Histamin am isolierten Meerschweinchenuterus gezeigt haben.

Die fast immer in Stufen von 5° durchgeführten Versuche ergaben folgendes (s. Tab. 6): Bei 32° größere Hubhöhen als bei 37°: bei 27° größere Hubhöhen als bei 32°. Bei 22° blieben dagegen die Hubhöhen im Vergleich zu 27°

[6] Langley, J. N.: J. Physiol. (Brit.) **39**, 235 (1909).

zurück und noch mehr bei 17° gegenüber 27°. Nur bei Anwendung sehr hoher Konzentrationen von Acetylcholin erreichte der Uterus fast stets das Maximum seiner Kontraktionsfähigkeit, unabhängig von der angewandten Temperaturstufe. Der Einfluß der Temperatur kommt folglich im wesentlichen in den niedrigen und mittleren Konzentrationen zum Ausdruck. Daß das Organ auch bei diesem Vorgehen nicht stärker, im Gegenteil weniger, in seiner Empfindlichkeit geändert wurde als bei den Auswaschversuchen, geht aus den fast immer vorgenommenen Kontrollprüfungen hervor: die Wiederholung einer kleinen Anfangskonzentration zwischen zwei Aufsetzversuchen oder am Ende zweier Aufsetzversuche ergab häufig mit dem Anfangswert gleiche Resultate.

Tabelle 7. a- und b-Werte unter Acetylcholin, berechnet aus der Beziehung von Pharmakonkonzentration und Hubhöhe nach der Formel $xb - ya - xy = 0$ mit Hilfe zweier Wertepaare (x_1, y_1 und x_2, y_2).

Versuch Nr.	Datum 1936	Temperatur °C	x_1	y_1	x_2	y_2	a	b
61a	22. XII.	37	8	30,0	32	48,0	8,0	60,0
		32	8	37,0	32	52,0	5,0	60,13
61b	22. XII.	37	4	10,0	16	34,0	26,0	96,0
		32	4	16,0	16	40,0	16,0	80,0
62a	23. XII.	37	8	25,0	32	44,0	10,86	58,94
		32	8	36,0	32	54,0	6,85	59,33
62b	23. XII.	37	8	42,0	32	92,0	18,42	138,70
		32	8	80,0	32	114,0	5,24	144,90
59a	20. XII.	32	8	36,0	32	48,0	4,0	54,0
		27	8	44,0	32	52,0	2,07	55,39
59b	20. XII.	32	8	36,0	32	76,0	10,70	93,50
		27	8	76,0	32	92,0	2,42	98,99
60a	21. XII.	32	8	47,0	32	64,0	4,38	72,98
		27	8	56,0	32	66,0	2,03	70,21
60b	21. XII.	32	4	70,0	16	108,0	3,56	132,30
		27	4	84,0	16	114,0	2,16	129,86
57a	17. XII.	27	4	34,0	16	52,0	3,42	63,09
		22	4	22,0	16	40,0	6,0	55,0
57b	17. XII.	27	4	44,0	16	90,0	8,90	141,90
		22	4	28,0	16	66,0	13,21	120,47
58a	18. XII.	27	8	23,0	32	42,0	12,16	57,96
		22	8	20,0	32	40,0	16,0	60,0
58b	18. XII.	27	8	29,0	32	55,0	13,63	78,41
		22	8	24,0	32	50,0	18,08	78,24
55a	15. XII.	27	4	58,0	16	72,0	1,40	73,40
		17	4	36,0	16	58,0	4,07	72,63
55b	15. XII.	27	4	86,0	16	120,0	2,43	138,24
		17	4	38,0	16	76,0	8,0	114,0
56a	16. XII.	27	4	44,0	16	59,0	2,05	66,54
		17	4	18,0	16	42,0	8,0	60,0
56b	16. XII.	27	4	74,0	16	94,0	1,56	102,86
		17	4	30,0	16	62,0	7,66	87,45

Die Analyse des Temperatureinflusses auf die in Aufsetzversuchen geprüfte Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins (s. Tab. 7) erfolgte wiederum ähnlich wie bei den Auswaschversuchen durch Anwendung der Formel

$$xb - ya - xy = 0.$$

Beim Heruntergehen von 37° auf 32° und von 32° auf 27° nimmt die Konstante a mit sinkender Temperatur ab. Beim Heruntergehen von 27° auf 22° wächst die Konstante a; im Intervall 27—17° ist das Anwachsen von a besonders stark, entsprechend der größeren Temperaturstufe. Die Konstante b ergab oft in den verschiedenen Temperaturstufen die gleichen oder nahe beieinanderliegende Werte. Die Konstante b in obiger Formel

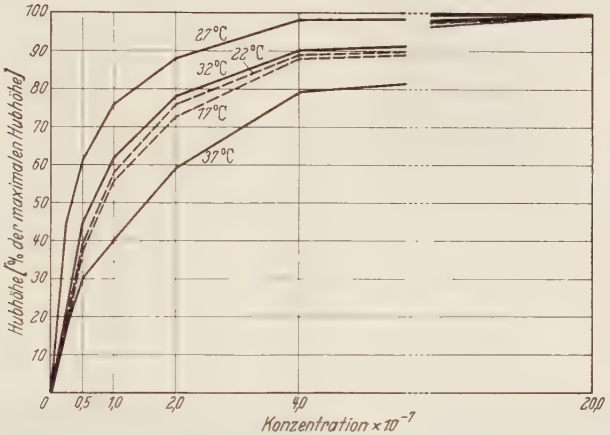


Abb. 5. Abhängigkeit der Kontraktionsgröße des Uterus unter Azetylcholin von Konzentration und Temperatur, ausgedrückt in Prozenten der maximalen Konzentration. Mittelwerte.

ist ein Maß für die maximale Hubhöhe, die unter den gegebenen Bedingungen von dem Organ erreicht werden kann. Es ist bemerkenswert, daß die aus dem Kurvenverlauf errechneten b-Werte in der Regel weitgehend übereinstimmen mit jenen Hubhöhen, welche die Organe bei Anwendung sehr hoher Acetylcholinkonzentrationen im Versuch erreichten.

Da in diesen Aufsetzversuchen im Gegensatz zu den Auswaschversuchen fast stets die maximale Hubhöhe, bis zu der der Uterus sich zu kontrahieren vermag, mitbestimmt wurde, konnten die unter den einzelnen Konzentrationen erreichten Hubhöhen in Prozenten der Maximalen errechnet und die Mittelwerte dieser Prozentzahlen graphisch dargestellt werden. Man erhält auf diese Weise genauere Werte als bei der rohen Mittelwertsberechnung (s. Abb. 5).

Die Aufsetzversuche haben also bezüglich der Verschiebung, die die Konzentrationswirkungskurve mit sinkender Temperatur erfährt, zu dem grundsätzlich gleichen Ergebnis geführt wie die Auswaschversuche.

3.

Die Beweiskraft der soeben geschilderten Aufsetzversuche ist theoretisch an die Voraussetzung geknüpft, daß die von einer bestimmten Acetylcholinkonzentration bewirkte Hubhöhe eine hinreichend lange Zeitspanne bestehen bleibt. Diese Zeitspanne müßte wenigstens so groß sein wie die Zeit, welche dem Ablauf eines ganzen Aufsetzversuches entspricht. Im folgenden Abschnitt wird gezeigt werden, daß diese Voraussetzung insbesondere bei der Temperatur von 37° nicht erfüllt ist.

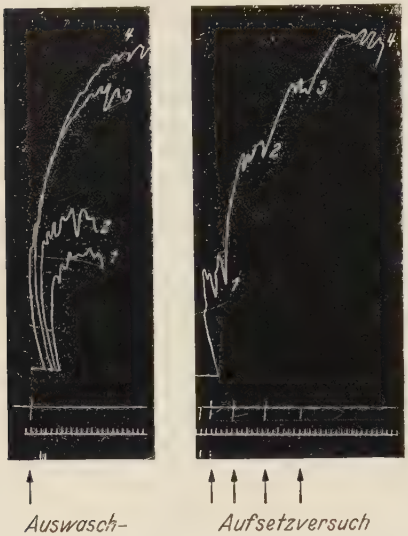


Abb. 6. Abhängigkeit der Kontraktionsgröße des isolierten Uterus unter Azetylcholin von der Konzentration im Auswasch- und im Aufsetzversuch bei 37° C.

Meerschweinchen Nr. 41b (12. XI. 1936); Gewicht 170 g. Drehmoment 1,8 g · cm. Hebelübertragung 1: 6,5. Zeitschreibung: jedes Intervall = 10 Sekunden.

↑ Azetylcholinzusatz entsprechend einer Endkonzentration von: $0{,}25 \times 10^{-7}$ (*1*); $0{,}5 \times 10^{-7}$ (*2*); $1{,}0 \times 10^{-7}$ (*3*); $2{,}0 \times 10^{-7}$ (*4*).

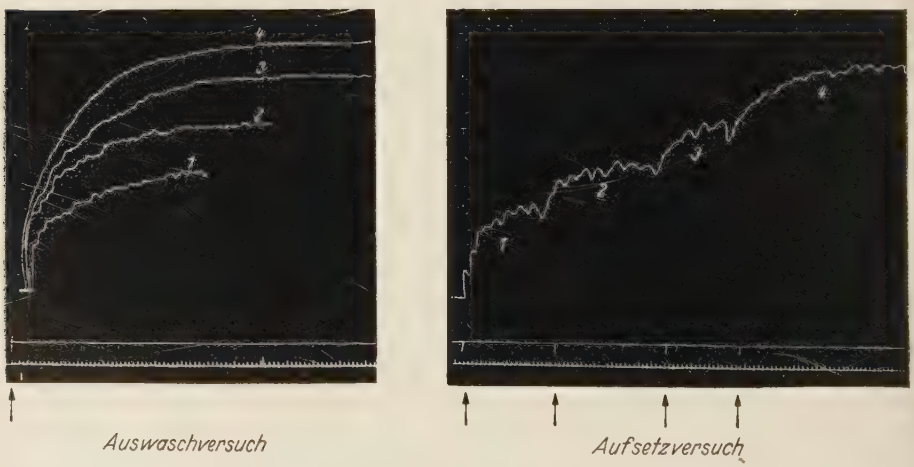


Abb. 7. Abhängigkeit der Kontraktionsgröße des isolierten Uterus unter Acetylcholin von der Konzentration im Auswasch- und im Aufsetzversuch bei 27° C.

Meerschweinchen Nr. 43b (13. XI. 1936); Gewicht 150 g. Drehmoment 1,8 g · cm. Hebelübertragung 1: 6,5. Zeitschreibung: jedes Intervall = 10 Sekunden.

↑ Acetylcholinzusatz entsprechend einer Endkonzentration von $0{,}25 \times 10^{-7}$ (*1*); $0{,}5 \times 10^{-7}$ (*2*); $1{,}0 \times 10^{-7}$ (*3*); $2{,}0 \times 10^{-7}$ (*4*).

Tabelle 8. Abhängigkeit der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Kontraktionsgröße von Acetylcholinkonzentration und Temperatur im Auswasch- und Aufsetzversuch am selben Organ.

t_L = Latenzzeit; t_1, t_2, t_3 und t_4 = denjenigen Zeiten, die bis zur Erreichung von $^1/_4$, $^1/_2$, $^3/_4$ und $^1/_1$ an maximaler Hubhöhe (h_1, h_2, h_3, h_4) verstreichen.

Temperatur	Konzentration	Zusatz	t_L	t_1	t_2	t_3	t_4	h_1	h_2	h_3	h_4
°C	$\cdot 10^{-7}$	Nr.	in Sek.					in mm			
Meerschweinchen Nr. 41 a. 170 g. Versuch vom 12. XI. 1936.											
37	0,25	2	6	15	21	27	42	7,5	15,0	22,5	30,0
	0,5	1	3	12	18	24	54	9,75	19,5	29,25	39,0
	1,0	3	5	12	15	24	72	14,5	29,0	43,5	58,0
	2,0	4	3	15	21	36	108	16,5	33,0	49,5	66,0
	20,0	18	6	12	21	42	180	17,0	34,0	51,0	68,0
	0,25	5					42				22,0
	0,5	6				Aufsetzversuch	84				40,0
	1,0	7					162				62,0
	2,0	8					240				70,0
27	0,25	9	15	27	36	48	78	8,5	17,0	25,5	34,0
	0,5	10	12	27	36	54	138	12,5	25,0	37,5	50,0
	1,0	11	12	24	36	66	192	15,5	31,0	46,5	62,0
	2,0	12	9	21	39	72	294	17,5	35,0	52,5	70,0
	20,0	17	9	21	42	84	420	17,5	35,0	52,5	70,0
	0,25	13					54				30,0
	0,5	14				Aufsetzversuch	198				49,0
	1,0	15					300				60,0
	2,0	16					360				70,0
Meersschweinchen Nr. 43 b. 160 g. Versuch vom 13. XI. 1936.											
27	0,25	1	15	40	66	186	438	11,5	23,0	34,5	46,0
	0,5	2	12	33	84	168	540	16,0	32,0	48,0	64,0
	1,0	3	12	33	102	198	660	20,5	41,0	61,5	82,0
	2,0	4	12	42	90	162	780	23,75	47,5	71,25	95,0
	0,25	5					200				36,0
	0,5	6				Aufsetzversuch	390				54,0
	1,0	7					620				70,0
	2,0	8					960				90,0
37	0,25	9	10	30	48	108	120	3,25	6,5	9,75	13,0
	0,5	10	9	15	30	66	150	7,5	15,0	22,5	30,0
	1,0	11	9	18	45	78	168	16,5	33,0	49,5	66,0
	2,0	12	9	15	36	72	198	21,5	43,0	64,5	86,0
	0,25	13					60				10,0
	0,5	14				Aufsetzversuch	132				30,0
	1,0	15					240				66,0
	2,0	16					360				86,0

Anmerkung: 4 weitere Versuche dieser Art wurden im Interesse der Raumersparnis nicht veröffentlicht. Das Gesamtmaterial kann eingesehen werden im Pharmakologischen Institut Frankfurt a. M.

Unter diesen Umständen hätte man erwarten sollen, daß die durch Aufsetzversuche gewonnenen Konzentrationswirkungskurven sich mehr

oder minder stark von den in Auswaschversuchen gewonnenen unterscheiden. Das Divergieren beider Kurven hätte sich weiterhin bei 37° stärker bemerkbar machen müssen als bei 27°.

Aus den bis jetzt gewonnenen Versuchsergebnissen war ein solches Divergieren nicht ersichtlich. Die mitgeteilten Auswasch- und Aufsetzversuche waren aber an verschiedenen Organen durchgeführt worden; feinere Unterschiede konnten in der Streuung der Versuchsresultate untergegangen sein. Solche Bedenken waren nur durch Vergleich von Auswasch- und Aufsetzversuch am selben Organ zu beseitigen (s. Abb. 6 u. 7 sowie Tab. 8).

Tabelle 9. a- und b-Werte unter Acetylcholin, berechnet aus der Beziehung von Pharmakonkonzentration und Hubhöhe nach der Formel $xb - ya - xy = 0$ mit Hilfe zweier Wertepaare (x_1, y_1 und x_2, y_2).

Versuch Nr.	Datum 1936	Temperatur °C	x_1	y_1	x_2	y_2	a	b
42a	13. XI.	37	8	26,0	32	47,0	11,7	64,0
	Auswaschversuch	27	8	40,0	32	55,0	4,57	64,10
42a	13. XI.	37	8	29,0	32	48,0	9,0	61,6
	Aufsetzversuch	27	8	36,0	32	50,0	4,77	59,0
43b	13. XI.	37	8	30,0	32	86,0	23,29	117,3
	Auswaschversuch	27	8	64,0	32	95,0	6,16	113,28
43b	13. XI.	37	8	30,0	32	86,0	23,29	117,3
	Aufsetzversuch	27	8	54,0	32	90,0	9,14	115,7
41b	12. XI.	37	8	60,0	32	106,0	11,0	136,5
	Auswaschversuch	27	8	98,0	32	118,0	2,65	127.97
41b	12. XI.	37	8	70,0	32	112,0	8,0	140,0
	Aufsetzversuch	27	8	89,0	32	116,0	3,6	141,5
41a	12. XI.	37	8	39,0	32	66,0	10,33	89,36
	Auswaschversuch	27	8	50,0	32	70,0	4,92	82,0
41a	12. XI.	37	8	40,0	32	70,0	10,66	91,7
	Aufsetzversuch	27	8	49,0	32	70,0	5,33	82,13
40	11. XI.	37	4	36,0	16	64,0	5,66	86,4
	Auswaschversuch	27	4	48,0	16	70,0	2,88	82,56
40	11. XI.	37	4	32,0	16	60,0	6,66	84,8
	Aufsetzversuch	27	4	46,0	16	70,0	3,37	84,8
39	10. XI.	37	4	22,0	16	44,0	8,0	66,0
	Auswaschversuch	27	4	30,0	16	48,0	4,0	60,0
39	10. XI.	37	4	17,0	16	38,0	11,02	63,93
	Aufsetzversuch	27	4	30,0	16	50,0	4,57	64,3

Die im Intervall 37 –27° teils mit absteigender, teils mit aufsteigender Temperatur ausgeführten Versuche ergaben keine charakteristischen Unterschiede zwischen den beiden im Aufsetz- und im Auswaschversuch erhaltenen Konzentrationswirkungskurven. Manchmal blieb die Kurve bei 37° im Aufsetzversuch gegenüber der bei gleicher Temperatur im Aus-

waschversuch zurück, manchmal aber lag sie etwas höher als diese; ähnlich verhielten sich beide bei 27° erhaltenen Kurvenarten. Dabei war die Zeitdauer, die zur Erreichung der den einzelnen Konzentrationen entsprechenden Endhöhen an Kontraktion nötig war, ganz verschieden; sie wuchs mit zunehmender Zahl der Zusätze beim Aufsetzversuch gegenüber dem Auswaschversuch.

Auch die Durchrechnung beider Kurvenarten mit Hilfe der Formel

$$xb - ya - xy = 0$$

ergab keine greifbaren Unterschiede (s. Tab. 9).

Die Konstante a wurde stets bei 27° kleiner gefunden als bei 37°. Diese Aussage gilt ohne nennenswerten Unterschied der Zahlenrelationen

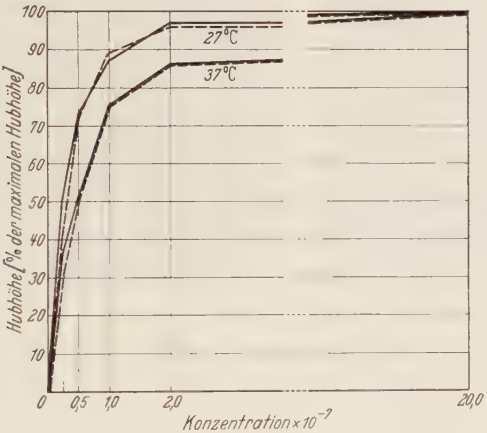


Abb 8. Abhängigkeit der Kontraktionsgröße des Uterus unter Acetylcholin von Konzentration und Temperatur im Auswasch- (durchgezogen) und im Aufsetzversuch (gestrichelt), ausgedrückt in Prozenten der maximalen Kontraktion. Mittelwerte.

ebenso für den Auswasch- wie für den Aufsetzversuch. Für die Größe b wurden weitgehend unabhängig von Temperatur und Versuchsanordnung Werte errechnet, die einer Konstanten nahekamen.

Das unterschiedslose Verhalten der im Aufsetz- und Auswaschversuch bei verschiedenen Temperaturstufen gewonnenen Konzentrationswirkungskurven wird auch deutlich, wenn man die unter den einzelnen Acetylcholinkonzentrationen erreichten Endhöhen in Prozenten der Maximalkontraktion errechnet und graphisch zur Darstellung bringt (s. Abb. 8).

Die Tatsache, daß im Auswasch- und Aufsetzversuch am selben Organ grundsätzlich das gleiche Ergebnis erzielt wurde, bedeutet nicht nur eine Bestätigung des in den beiden vorhergehenden Abschnitten erhobenen Befundes, daß die Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins bei 37° tiefer liegt als bei 27°, sondern sie vermag darüber hinaus einen ersten Beitrag für die Erklärung dieses Phänomens zu liefern.

Diese Folgerung wird aber erst klar heraustreten, nachdem die Versuche über die Erschlaffungsgeschwindigkeit der durch Acetylcholin bei verschiedener Temperatur hervorgerufenen Kontraktionen abgehandelt sind.

IV. Abhängigkeit der Erschlaffungsgeschwindigkeit von Konzentration und Temperatur.

Läßt man auf den isolierten Meerschweinchenuterus eine geeignete Konzentration von Acetylcholin wirken und beobachtet den Kurvenablauf nicht nur bis zu dem Punkt, bei dem der Uterus die Endhöhe an

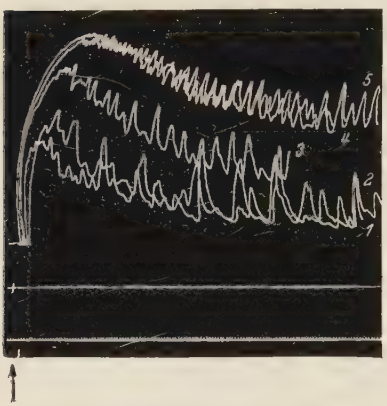


Abb. 9. Abhängigkeit der Erschlaffungsgeschwindigkeit des isolierten Uterus unter Acetylcholin vonder Konzentration bei 37° C. Meerschweinchen Nr. 25 (16. X. 1936); Gewicht 170 g. Drehmoment 1,4 g · cm. Hebelübertragung 1: 3,8. Zeitschreibung: jedes Intervall = 6 Sekunden.
↑ Acetylcholinzusatz entsprechend einer Endkonzentration von: $0{,}25\times10^{-7}$ (*1*); $0{,}5\times10^{-7}$ (*2*); $1{,}0\times10^{-7}$ (*3*); $2{,}0\times10^{-7}$ (*4*); $4{,}0\times10^{-7}$ (*5*).

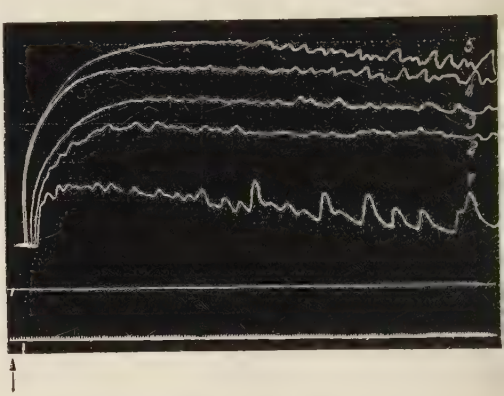


Abb. 10. Abhängigkeit der Erschlaffungsgeschwindigkeit des isolierten Uterus unter Acetylcholin von der Konzentration bei 27° C.
Meerschweinchen Nr. 26 (19. X. 1936); Gewicht 170 g. Drehmoment 1,4 g · cm. Hebelübertragung 1 : 3,8. Zeitschreibung: jedes Intervall = 6 Sekunden.
↑ Acetylcholinzusatz entsprechend einer Endkonzentration von: $0{,}25\times10^{-7}$ (*1*); $0{,}5\times10^{-7}$ (*2*); $1{,}0\times10^{-7}$ (*3*); $2{,}0\times10^{-7}$ (*4*); $4{,}0\times10^{-7}$ (*5*).

Kontraktion erreicht hat, sondern eine beträchtliche Zeit darüber hinaus, ohne das Pharmakon wegzuwaschen, so zeigt sich, daß das Organ die erreichte Endhöhe nicht dauernd beibehält, sondern allmählich wieder erschlafft. Die Geschwindigkeit, mit der die Erschlaffung bei äußerlich erhaltener Acetylcholinkonzentration vor sich geht, ist ähnlich wie in der Kontraktionsphase abhängig von Konzentration und Temperatur (s. Abb. 9 u. 10 sowie Tab. 10).

Die Zeiten, die verstreichen, bis das Organ zu einem bestimmten Prozentsatz, z. B. 80, 60 und 40 % seiner jeweils erreichten Hubhöhe wieder heruntergegangen ist, sind im allgemeinen um so größer, je höher die angewandte Konzentration war. Die Geschwindigkeit, mit der das Organ erschlafft, ist demgemäß um so kleiner, je höher die angewandte Konzentration ist.

Tabelle 10. Abhängigkeit der Erschlaffungsgeschwindigkeit von der Acetylcholinkonzentration bei 37 und 27° C.
Zeiten (t in Sekunden), die vom Pharmakonzusatz ab vergehen, bis der Hebel auf Hubhöhe (h in mm) abgesunken ist, die 95, 90, 85, 80, 60 und 40% der maximal erreichten Hubhöhen (100%) betragen.

Temperatur: 37°.

Konzentration · 10^{-7}	100%		80%		60%		40%	
	h	t	h	t	h	t	h	t
			Versuch Nr. 25 vom 16. X. 1936.					
0,25	35	60	28	120	21	162	14	300
0,5	45	96	36	126	27	165	18	270
1,0	62	84	49,6	150	37,2	252	24,8	468
2,0	70	66	56	318	42	540		
4,0	72	72	57,6	276	43,2	594		
			Versuch Nr. 23 vom 14. X. 1936.					
0,25	38		30,4	50	22,8	87	15,2	123
0,5	62		49,6	87	37,2	132	24,8	192
1,0	66		52,8	192	39,6	300	28,4	408
			Versuch Nr. 27a vom 20. X. 1936.					
0,25	37		29,6	192	22,2	234	14,8	318
0,5	63		50,4	126	37,8	240	25,2	330
1,0	80		64	200	48	336	32	507

Temperatur: 27°.

Konzentration · 10^{-7}	100%		95%		90%		85%	
	h	t	h	t	h	t	h	t
			Versuch Nr. 26 vom 19. X. 1936.					
0,25	22		20,9	204	19,8	216	18,7	258
0,5	43		40,85	336	38,7	522	36,55	756
1,0	52		49,4	462	46,8	876		
2,0	62		58,9	684	55,8	972		
4,0	71		67,45	528	63,9	912		
			Versuch Nr. 24 vom 15. X. 1936.					
0,25	26		20,8	300	15,6	480	10,4	762
0,5	45		42,75	390	40,5	702	38,25	942
1,0	53		50,35	516	47,7	952	45,05	1202
			Versuch Nr. 27b vom 20. X. 1936.					
0,25	46		36,8	378	27,6	456		
0,5	62		58,9	180	55,8	384	52,7	768
1,0	63		59,85	660	56,7	972		

Der Einfluß der Temperatur auf die Erschlaffungsgeschwindigkeit ist besonders eindrucksvoll. Das Organ erschlafft bei 37° wesentlich rascher als bei 27°. In einem Zeitraum, in dem bei 27° eine Erschlaffung um nur 5—10 % der erreichten Hubhöhen eintritt, erfolgt bei 37° bereits eine Erschlaffung um 40—60 %.

Die Tatsache der hohen Erschlaffungsgeschwindigkeit des Organs bei 37° konnte zu der Vermutung Anlaß geben, das in den vorhergehenden

Abschnitten immer wieder gefundene Zurückbleiben der Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins bei 37° möchte mit diesem Umstand irgendwie in Zusammenhang stehen. Derselbe Vorgang, der nach Erreichung der jeweiligen Endhöhe an Kontraktion bei 37° zu einer so raschen Senkung des Muskelhebels führte, konnte bereits während der Kontraktionsphase wirksam sein, so daß das Organ, wenn es sich mit unendlicher Schnelligkeit kontrahiert hätte, wesentlich höhere Endhöhen erreicht haben würde, als es in der Tat erreicht hat. Die wirklich beobachtete Kurve war dann in der Anstiegsphase die Resultierende aus der ideellen jeweiligen Anstiegshöhe und dem bereits wirksamen Abklingungsvorgang. Es war aber möglich, die ideellen Endhöhen an Kontraktion rechnerisch zu ermitteln, falls die Erschlaffungskurve in ihrem Verlauf feststand.

Zu diesem Zweck wurde für den Erschlaffungsvorgang die bekannte Abklingungsfunktion (e^{-kt}), die ja für so viele Abklingungsvorgänge chemischer und physikalischer Natur Gültigkeit hat (Zuckerinversion, Kondensatorentladung usw.), herangezogen. Für biologische Vorgänge hat sie unter anderen Hill [7] für die Erschlaffung des Rectus abdominis des Frosches nach Behandlung mit Nikotinlösung angewandt.

Die in Tabelle 10 niedergelegten Werte wurden daher mit Hilfe der Formel

$$y = c_0 \cdot e^{-kt}$$

durchgerechnet und für jede Erschlaffungskurve die beiden Konstanten k und c_0 ermittelt; k ist ein Maßstab für den Krümmungsablauf, c_0 ein Maßstab für die ideelle Endhöhe an Kontraktion, die der Muskel erreicht haben würde, wenn er sich mit unendlicher Geschwindigkeit kontrahiert hätte (s. Tab. 11).

Bezogen auf gleiche Konzentrationen von Acetylcholin sind die k-Werte bei 37° stets beträchtlich größer als bei 27°. In jedem Versuch sinkt der k-Wert mit steigender Konzentration. Das stellt nur einen genaueren zahlenmäßigen Ausdruck dafür dar, daß die Erschlaffungsgeschwindigkeit bei 37° größer ist als bei 27° und daß sie bei konstanter Temperatur mit zunehmender Konzentration abnimmt. Die errechneten c_0-Werte sind, wie zu erwarten war, mehr oder minder höher als die in der Tat gefundenen Hubhöhen; ja es hat sogar den Anschein, als ob der Unterschied in den 37°-Versuchen größer sei als in den 27°-Versuchen. Die Zahlen sind aber nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, da es nicht möglich war, die Abklingungsversuche in beiden Temperaturstufen am selben Organ durchzuführen. Es zeigte sich nämlich immer wieder, daß das mehreren Konzentrationen von Acetylcholin nacheinander für so lange Zeit ausgesetzte Organ schließlich beträchtlich geschädigt war.

Die Beurteilung wurde aus diesem Grunde auf anderem Wege versucht. Wenn das Zurückbleiben der Konzentrationswirkungskurve des Acetyl-

[7] Hill, A. V.: J. Physiol. (Brit.) **39**, 361 (1909/10).

Tabelle 11. Krümmungskonstanten (k) und ideelle Ausgangshöhen (c_0) der Erschlaffungskurven unter verschiedenen Acetylcholinkonzentrationen und bei verschiedener Temperatur, berechnet gemäß Tabelle 10 mit der Formel

$$k = \frac{\log y_1 - \log y_2}{(t_2 - t_1) \cdot \log e}.$$

y_1, y_2 = Hubhöhe in mm; t_1, t_2 = Zeit in Min.; $c_0 = y \,.\, e^{kt}$.

Temperatur °C	Konzentration · 10−7	k	c_0	Gefundene Hubhöhe
	Versuch Nr. 25 vom 16. X. 1936.			
37	0,25	0,411	63,7	35,0
	0,5	0,443	91,2	45,0
	1,0	0,169	75,7	62,0
	2,0	0,078	84,6	70,0
	4,0	0,054	73,9	72,0
	Versuch Nr. 23 vom 14. X. 1936.			
37	0,25	0,464	44,68	38,0
	0,5	0,383	86,48	62,0
	1,0	0,160	88,05	66,0
	Versuch Nr. 27a vom 20. X. 1936.			
37	0,25	0,411	110,20	37,0
	0,5	0,151	67,20	63,0
	1,0	0,125	88,82	80,0
	Versuch Nr. 26 vom 19. X. 1936.			
27	0,25	0,270	52,40	22,0
	0,5	0,018	45,05	43,0
	1,0	0,009	52,15	52,0
	2,0	0,011	62,17	62,0
	4,0	0,009	71,20	71,0
	Versuch Nr. 24 vom 15. X. 1936.			
27	0,25	0,096	28,01	26,0
	0,5	0,010	45,13	45,0
	1,0	0,007	53,15	53,0
	Versuch Nr. 27b vom 20. X. 1936.			
27	0,25	0,221	49,06	46,0
	0,5	0,016	62,17	62,0
	1,0	0,010	63,17	63,0

cholins bei 37° darauf beruhte, daß der Vorgang der größeren Erschlaffungsgeschwindigkeit bereits in der Kontraktionsphase wirksam war, so mußte die aus den tatsächlich erreichten Endhöhen an Kontraktion geformte Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins gegenüber der aus den ideellen Endhöhen (c_0-Werten) geformten um denselben Betrag, ja um einen noch höheren zurückbleiben, als die 37°-Kurven im allgemeinen gegenüber den 27°-Kurven zurückblieben. Bei 27° durfte ein solcher Unterschied nicht bemerkbar sein. Als Maßstab für die Veränderung der Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins erwies sich in den vorhergehenden Abschnitten die Konstante a brauchbar. Es wurde deshalb bei sämtlichen Ver-

Tabelle 12. a- und b-Werte, berechnet aus der Beziehung von Acetylcholinkonzentration und Hubhöhe — wirklich erreichter und ideeller — gemäß Tabelle 10 und 11 nach der Formel $xb - ya - xy = 0$ mit Hilfe zweier Wertepaare (x_1, y_1 und x_2, y_2).

Versuch Nr.	Datum 1936	Temperatur °C	x_1	y_1	x_2	y_2	a	b
25 Versuch	16. X.	37	2	35	32	72	2,43	77,53
25 Rechnung	16. X.	37	2	63,7	32	73,9	0,35	74,70
23 Versuch	14. X.	37	2	38	8	66	2,65	86,64
23 Rechnung	14. X.	37	2	44,68	8	88,05	3,83	130,24
27a Versuch	20. X.	37	4	63	8	80	2,96	109,62
27a Rechnung	20. X.	37	4	67,20	8	88,82	3,58	127,35
26 Versuch	19. X.	27	2	22	32	71	5,58	83,38
26 Rechnung	19. X.	27	2	52,4	32	71,2	0,78	72,97
24 Versuch	15. X.	27	2	26	8	53	4,24	81,62
24 Rechnung	15. X.	27	2	28,01	8	53,15	3,42	75,91
27b Versuch	20. X.	27	2	46	8	63	1,12	71,76
27b Rechnung	20. X.	27	2	49,06	8	63,17	0,87	65,40

suchen die Konstante a für die beobachteten Hubhöhen und für die errechneten ideellen Hubhöhen ermittelt (s. Tab. 12).

Die aus den ideellen Hubhöhen berechnete Konstante a zeigte kein gesetzmäßiges Verhältnis zu der aus den beobachteten Hubhöhen berechneten. Bald war sie kleiner als diese, bald war sie größer. Ein charakteristischer Unterschied in beiden Temperaturstufen trat nicht zutage.

Die Vermutung, das Zurückbleiben der Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins bei 37° stehe in ursächlichem Zusammenhange mit der erhöhten Erschlaffungsgeschwindigkeit des Organs bei dieser Temperatur, verliert damit an Boden. Wenn demzufolge in der Kontraktionsphase nichts von der späteren Erschlaffungsphase steckt, so wird auch verständlich, daß Auswasch- und Aufsetzversuche, trotz der verschiedenen zeitlichen Verhältnisse in beiden Fällen, dieselben Ergebnisse zeigten.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Bei der Einwirkung von Acetylcholin auf den isolierten Meerschweinchenuterus wurden, sowohl hinsichtlich der Geschwindigkeit, mit der die Reaktion verläuft, wie hinsichtlich der erreichten Gleichgewichtszustände, gesetzmäßige Resultate erhalten. Es ist die Frage, wie weit diese Ergebnisse Aufschluß über den zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus geben können.

Die Geschwindigkeit, mit der die Reaktion zwischen Acetylcholin und dem Uterus verläuft, ist offenbar groß, ihr Temperaturkoeffizient jedoch klein. Der Temperaturkoeffizient der Geschwindigkeit des Kontraktionsbeginns stimmt fast völlig mit dem des Kontraktionsablaufs überein. Stellt man sich, wie das früher häufig geschah, auf den Standpunkt, ein niedriger Temperaturkoeffizient ($Q_{10} < 1{,}5$) sei der Ausdruck für ein physikalisches Geschehen, z. B. einen Diffusionsvorgang, ein hoher Temperaturkoeffizient ($Q_{10} = 2-3$) zeige dagegen das Vorliegen eines chemischen Vorgangs an, so käme man zu dem Schluß, daß, sowohl in der Phase der Latenz wie in der Phase der Kontraktion, unter Acetylcholin ein physikalischer Vorgang, z. B. die Diffusion des Mittels zu den Wirkungsorten hin, in Erscheinung tritt. Die Richtigkeit dieses Schlusses ist aber aus mehreren Gründen zweifelhaft.

Die geschilderten Gesetzmäßigkeiten gelten, wie in einer früheren Arbeit [3] bereits auseinandergesetzt wurde, zunächst nur für einfache Vorgänge in einem homogenen Milieu, nicht aber ohne weiteres für Kettenreaktionen in einem inhomogenen Milieu. Letztere liegen aber ohne Zweifel bei der komplizierten Reaktion zwischen Acetylcholin und dem isolierten Organ vor. Andererseits ist der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Acetylcholin und Uterus zwar absolut klein, aber doch stärker temperaturabhängig als sogar der chemischer Reaktionen. Der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Reaktionen, in verschiedenen Temperaturbereichen untersucht, ist bekanntlich nicht konstant, sondern nimmt mit zunehmender Temperatur ab. Seine Veränderlichkeit ist aber an verhältnismäßig enge Grenzen gebunden. Das kommt zum Ausdruck, wenn man aus den beobachteten Temperaturkoeffizienten mit Hilfe der Arrheniusschen Formel

$$\frac{v_2}{v_1} = \mu^{2\,\frac{T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1}}$$

die μ-Werte berechnet: μ wird dann für einen weiten Temperaturbereich konstant gefunden. Für biologische Vorgänge und Fermentreaktionen hat sich dagegen immer wieder gezeigt, daß die mit der Arrheniusschen Formel berechneten μ-Werte inkonstant sind und mit sinkender Temperatur stark ansteigen. Rechnet man nun aus den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Temperaturkoeffizienten der Latenzzeit und des Kontraktions-

Tabelle 13. Mittlere Temperaturkoeffizienten (Q_5 bzw. Q_{10}) nach Tabelle 2 und 4 und μ-Werte;

$$\mu = 4{,}6 \cdot \frac{T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{v_2}{v_1}.$$

Temperatur °C	Latenzzeiten		Halbwertszeiten		Einviertelwertszeiten		Dreiviertelwertszeiten	
	Q_5	μ	Q_5	μ	Q_5	μ	Q_5	μ
17—22	1,44	15 695						
22—27	1,41	12 150	1,43	12 650	1,40	11 910	1,47	13 620
27—32	1,26	8 452	1,36	11 240	1,31	9 875	1,36	11 240
32—37	1,27	9 029	1,22	7 512	1,22	7 512	1,25	8 430
	Q_{10}	μ	Q_{10}	μ	Q_{10}	μ	Q_{10}	μ
17—27	2,08	12 730	2,16	13 400	2,04	12 390	2,05	12 480
27—37	1,44	6 777	1,62	8 962	1,61	8 847	1,64	9 189

ablaufs unter Acetylcholin die μ-Werte mit Hilfe dieser Formel aus, so ergibt sich folgendes (s. Tab. 13):

Die μ-Werte sind inkonstant; sie steigen mit sinkender Temperatur an, und zwar im Bereich von 37—17° von etwa 7000 bis auf 16000. Diese Aussage gilt in gleicher Weise für die Latenzzeiten wie für die Halbwertszeiten, die Einviertelwerts- und Dreiviertelwertszeiten.

Dieses Verhalten der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Acetylcholin und dem isolierten Uterus muß notwendigerweise dazu führen, den Gedanken, es handle sich um eine Diffusion des Acetylcholins zu den Wirkungsorten hin, fallen zu lassen und die Aufmerksamkeit auf das Geschehen im Organ selbst hinzulenken. Auch am quergestreiften Muskel waren in einer früheren Arbeit [3] unter der Einwirkung von Acetylcholin Temperaturkoeffizienten und μ-Werte der Latenzzeiten gefunden worden, die, sowohl in ihrer Größe wie in ihrer Stufung, den hier niedergelegten weitgehend ähneln. Damals konnte durch Vergleich mit entsprechenden Werten für die Temperaturkoeffizienten der Latenzzeiten bei elektrischer Reizung zumindesten wahrscheinlich gemacht werden, daß in der Reaktion zwischen Acetylcholin und quergestreiftem Muskel das Geschehen im Organ dominiert. Messungen über die Temperaturabhängigkeit der Latenzzeit bei elektrischer Reizung des isolierten Meerschweinchenuterus liegen leider vorerst noch nicht vor. Bei der spärlichen Bearbeitung, die die elektrische Reizung isolierter glattmuskeliger Organe bisher erfahren hat, ist es höchstens möglich, zum Vergleich die Versuchsergebnisse an einem ganz anderen glattmuskeligen Organ heranzuziehen. Viale [8] fand bei elektrischer Reizung des Froschmagens im Temperaturbereich von 0—40° Temperaturkoeffizienten Q_5 von 1,41—1,46 und entsprechende μ-Werte von 11600—12700. In der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Acetyl-

[8] Viale, G.: Arch. ital. de Biol. **72**, 30 (1923).

cholin und Uterus kommt daher wahrscheinlich ebenfalls der Reaktionsablauf im Organ selbst zum Ausdruck, der durch Acetylcholin nur in Gang gesetzt wird.

Daß nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch die durch Acetylcholin erreichten Gleichgewichtszustände, gemessen an der Kontraktionsgröße des Organs, in charakteristischer Weise temperaturabhängig sind, ist das zweite wesentliche Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Während die Kontraktionsgröße des Uterus unter der Einwirkung von Orasthin mit steigender Temperatur kontinuierlich zunimmt, verhält sich Acetylcholin aber abweichend: die Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins wird bei Steigerung der Temperatur von 17 auf 27° erhöht, bei weiterer Steigerung der Temperatur von 27 auf 37° dagegen erniedrigt. Diese Tatsache läßt die Frage aufwerfen, ob nicht in dem Zurückbleiben der Kontraktionsgröße des Organs bei 37° die bekannte hohe Verseifungsgeschwindigkeit des Acetylcholins zum Ausdruck kommt. Die Verseifungsgeschwindigkeit des Acetylcholins könnte ja, zwar schon bei 17° und bei 27° wirksam, bei 37° so groß werden, daß sie die eigentlich zu erwartende Kurve unter das Niveau der bei 27° und sogar der bei 17° erhaltenen herunterdrückt. Für die Erörterung dieser Frage ist es zweckmäßig, zwei Fälle zu betrachten, die beide möglich sind. Erstens könnte die Verseifungsgeschwindigkeit des Acetylcholins zwar hoch, aber doch nicht so hoch sein, daß sie bei Erreichung der jeweiligen Endgröße an Kontraktion zum völligen Verschwinden des Acetylcholins geführt hätte: in diesem Falle würde die Zerstörung des Stoffes mehr oder minder weit in die Erschlaffungsphase hineinreichen, ja sich noch über die ganze Erschlaffungsphase und darüber hinaus erstrecken können. Zweitens könnte die Verseifungsgeschwindigkeit des Acetylcholins so groß sein, daß bereits in der Kontraktionsphase die gesamte zur Wirkung gelangte Acetylcholinmenge verseift wird.

Drei Befunde der vorliegenden Arbeit sprechen dagegen, daß eine Verseifung des Acetylcholins über die Kontraktionsphase hinaus entscheidend wirksam ist und damit die Gleichgewichtszustände wesentlich verändert. Sowohl die direkte Betrachtung der Erschlaffungskurven wie ihre Durchrechnung mit der Abklingungsformel ($y = c_0 \cdot e^{-kt}$) hat einwandfrei ergeben, daß unabhängig von der Temperatur die Erschlaffungsgeschwindigkeit mit zunehmender Acetylcholinkonzentration abnimmt. Wenn man in der Erschlaffungsphase die jeweils noch vorhandene Hubhöhe als Ausdruck für die jeweils noch wirksame, mithin nicht verseifte Acetylcholinmenge betrachtet, so könnte die angewandte Formel ohne weiteres der Ausdruck für eine fortschreitende Verseifung des Acetylcholins sein, die ja als Monomolekularreaktion, ähnlich der Zuckerinversion, theoretisch nach dieser Funktion verlaufen müßte. Bei einer Verseifung des Acetylcholins müßte die Verseifungsgeschwindigkeit mit zunehmender Anfangskonzentration an Acetylcholin ansteigen, und zwar proportional dieser Anfangskonzentration; die Krümmungskonstante der Kurven müßte

dagegen stets die gleiche bleiben. Die erhobenen Befunde widersprechen dem: die Erschlaffungsgeschwindigkeit sank mit steigender Acetylcholinkonzentration, die Krümmungskonstante war inkonstant; sie wurde ebenfalls mit steigender Konzentration kleiner. Die erhaltenen Erschlaffungskurven können also nicht als einfacher Ausdruck einer fortschreitenden Verseifung des Acetylcholins betrachtet werden. Der zweite Befund, der in dieselbe Richtung weist, betrifft das in Kapitel IV dieser Arbeit bereits erörterte Verhältnis der ideellen, durch Rückverfolgung der Abklingungskurven errechneten Hubhöhen bei 37° zu den tatsächlich beobachteten. Aus diesem Verhältnis mußte geschlossen werden, das in der Erschlaffungsphase wirksame Geschehen könne nicht schon in der Kontraktionsphase stecken. Diese Folgerung bleibt selbstverständlich auch dann richtig, wenn im besonderen unter diesem Geschehen die Verseifung des Acetylcholins verstanden wird. Der dritte Befund schließlich, der einer Beeinflussung der Gleichgewichtszustände durch fortschreitende Verseifung des Acetylcholins besonders eindrucksvoll widerspricht, ist die völlige Übereinstimmung der im Aufsetz- und im Auswaschversuch erhaltenen Ergebnisse. Da in den Aufsetzversuchen die nächsthöhere Konzentration immer erst dann geschaffen wurde, wenn der Uterus seine Endhöhe an Kontraktion erreicht bzw. überschritten hatte, hätte sich im Falle einer fortschreitenden Verseifung des Acetylcholins jede neue Kontraktionswelle gewissermaßen auf einem abgleitenden Niveau ausbilden müssen; die den einzelnen Konzentrationen zugehörigen Endhöhen hätten dann notwendigerweise immer mehr gegenüber denen zurückbleiben müssen, die bei sofortigem Zusatz der gleichen Konzentration im Auswaschversuch erreicht wurden; das war aber nicht der Fall.

Die Annahme, das Zurückbleiben der Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins bei 37° gegenüber der bei 27° stehe im Zusammenhang mit einer bei dieser Temperatur stark wirksamen Verseifung des Acetylcholins, kann also für den Fall als widerlegt gelten, daß die Acetylcholinverseifung über die Kontraktionsphase mehr oder minder lang hinausreicht. Sehr viel schwieriger ist die Widerlegung aber für den anderen Fall, die Acetylcholinverseifung sei bereits in der Kontraktionsphase vollendet. Als Gegenargument kann hier nur folgende theoretische Überlegung gelten: Die Acetylcholinverseifung ist ein exothermer Vorgang, sie wird daher mit steigender Temperatur geschwächt. Obwohl also die Acetylcholinverseifung bei höherer Temperatur schneller verläuft, sind die Mengen an nicht verseiftem Acetylcholin, wenn die Verseifung zum Gleichgewicht gekommen ist, bezogen auf die gleichen Ausgangskonzentrationen, bei höherer Temperatur größer als bei niedrigerer. Da für den betrachteten Fall die Erreichung dieses Gleichgewichtszustands zeitlich mit dem Punkt, an dem die Endhöhe an Kontraktion erreicht wird, zusammenfällt oder sogar noch früher liegt, hätte die Kontraktionsgröße bei 37° die bei 27° sogar noch übertreffen müssen. Damit scheint auch für diesen Fall die An-

nahme unwahrscheinlich, das Zurückbleiben der Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins bei 37° stehe im Zusammenhang mit einer Verseifung dieses Mittels.

In den ganzen Erörterungen über eine eventuelle Beeinflussung der Gleichgewichtszustände durch eine Verseifung des Acetylcholins war stillschweigend vorausgesetzt worden, daß die eigentlichen Wirkungseffekte dem unzersetzten Acetylcholin als solchem zuzuschreiben sind, und daß alle Vorgänge, die zur Hydrolyse dieses Stoffes führen, dem Kontraktionseffekt entgegenwirken. Wir stehen damit vollkommen auf dem Boden der üblichen Lehrmeinung. Auf dieser Voraussetzung basiert ja auch der Versuch, die bekannte Sensibilisierung der Acetylcholinwirkung durch Physostigmin[9] zu erklären. Nach Loewi und Navratil[10] soll Physostigmin die im Herzgewebe vorkommende Esterase, welche die Verseifung des Acetylcholins katalysiert, in ihrer Wirksamkeit hemmen und damit zu einer Wirkungssteigerung des Acetylcholins führen. Ähnliches gilt nach Loewi[11] und Matthes[12] für das Blut. Es ist aber auch denkbar, umgekehrt den Ablauf der Acetylcholinverseifung als den eigentlichen Wirkungsfaktor zu betrachten. Für einen solchen Wirkungsmechanismus des Acetylcholins sind bis jetzt allerdings unseres Wissens keine zwingenden Beweise beigebracht worden. Eine Diskussion über diese Frage erscheint daher vorerst verfrüht.

Da die möglichen Veränderungen des einwirkenden Pharmakons keine befriedigende Erklärung für die beobachtete Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtslage gebracht haben, muß sich notwendigerweise die Betrachtung der Beziehung zwischen Pharmakon und Substrat bzw. dem Substrat selbst zuwenden. Clark[5] hat, wie bereits erwähnt, die Konzentrationswirkungsbeziehung des Acetylcholins am Rectus abdominis und am ausgeschnittenen Herzstreifen des Frosches mit der Gleichung

$$K \cdot x = \frac{y}{100 - y}$$

(x Pharmakonkonzentration, y Wirkung in Prozent der Maximalen)

übereinstimmend gefunden und daraus auf eine lockere chemische Bindung zwischen Pharmakon und Zellsubstrat geschlossen. Nimmt man nämlich an, Pharmakon und irgendein Zellbestandteil vereinigen sich, ähnlich wie Sauerstoff und Hämoglobin, zu einer reversiblen lockeren Bindung

$$\mathrm{Ph} \cdot Z \rightleftarrows \mathrm{Ph} \cdot Z,$$

[9] Führer, H. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **82**, 51 (1918). — [10] Loewi, O., u. E. Navratil: Pflügers Arch. **206**, 123, 135 (1924); **214**, 678, 689 (1926). — [11] Engelhart, E., u. O. Loewi: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **150**, 21 (1930). — [12] Matthes, K.: J. Physiol. (Brit.) **70**, 338 (1930).

so kommt man durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf diesen Vorgang, wie in einer früheren Arbeit [3] ausführlicher auseinandergesetzt wurde, zu obiger Gleichung, die identisch ist mit der Gleichung

$$xb - ya - xy = 0.$$

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß auch auf die Konzentrationswirkungsbeziehung zwischen Acetylcholin und isoliertem Meerschweinchenuterus diese Formel anwendbar ist. Es wurde weiter gezeigt, daß der Temperatureinfluß auf die Konzentrationswirkungskurve des Acetylcholins auch an diesem Organ, ähnlich wie beim quergestreiften Muskel [3], sich fast ausschließlich in einer Veränderung der Konstante a ausdrückt. Die Konstante a ist aber ein Maß für die Gleichgewichtskonstante, genauer für die Dissoziationskonstante der hypothetischen Pharmakon-Zellverbindung. Wenn die Gleichgewichtskonstante einer Reaktion mit Temperaturänderung variiert, so muß der Vorgang notwendigerweise mit Wärmetönung (positiver oder negativer) verlaufen. Das ergibt sich ohne weiteres aus der Formel

$$\ln k = \frac{U}{RT} + C,$$

die durch Integration der bekannten van't Hoffschen Gleichung

$$\frac{d \ln k}{dT} = -\frac{U}{RT^2}$$

erhalten wird.

Im Bereich von 17–27° wurde in allen Versuchen a mit steigender Temperatur kleiner, im Bereich von 27–37° dagegen größer. Das Kleinerwerden der Gleichgewichtskonstante mit steigender Temperatur setzt eine positive Wärmetönung, das Größerwerden eine negative Wärmetönung voraus. Das heißt also: die Dissoziation der hypothetischen Pharmakon-Zellverbindung müßte zwischen 17 und 27° mit positiver Wärmetönung, zwischen 27 und 37° mit negativer Wärmetönung verlaufen. Für den Bindungsprozeß gilt das Umgekehrte, d. h.: Die Bildung der hypothetischen Pharmakon-Zellverbindung müßte zwischen 17 und 27° mit negativer Wärmetönung, also endotherm, zwischen 27 und 37° mit positiver Wärmetönung, also exotherm zustande kommen.

Die hypothetische Verbindung des Acetylcholins mit einem Bestandteil des isolierten Meerschweinchenuterus würde also zwischen 27 und 37° in Analogie zu der hypothetischen Acetylcholinverbindung des quergestreiften Muskels und mit Verbindungen, wie Sauerstoffhämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin, stehen. Bei allen diesen würde es sich um exotherme Verbindungen handeln, deren Bildung durch Temperaturerhöhung geschwächt wird. Man kann versuchen, ein Urteil über die Größe der Wärmemengen zu gewinnen, die bei Entstehung der hypotheti-

schen Verbindung frei werden, wenn man U mit Hilfe der aus der van't Hoffschen Grundgleichung durch Integration über ein bestimmtes Tempraturintervall $(T_2 - T_1)$ und Umformung ableitbaren Formel

$$U = -4{,}6 \cdot \frac{T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{k_2}{k_1} \text{ (cal)}$$

berechnet. Es wurden deshalb zunächst die a- bzw. k-Werte sämtlicher Versuche, die im Intervall 27—37° vorgenommen worden waren (Tabelle 5, 7, 9), zur Berechnung der U-Werte herangezogen (s. Tab. 14).

Tabelle 14. — U-Werte.

Temperatur °C	Aufsetzversuche		Auswaschversuche	
	Versuch Nr.	Einzelwerte	Versuch Nr.	Einzelwerte
37—32	61a	17 800	54a	9 600
	61b	18 300	54b	10 800
	62a	17 400		
	62b	47 500		
Mittelwerte:		25 200		10 200
32—27	59a	24 100	50a	7 900
	59b	54 300	47	10 300
	60a	28 100	54a	30 200
	60b	18 200	54b	16 500
Mittelwerte:		31 200		16 200
37—27			28	12 400
			30	20 000
			29	10 000
			33	6 600
			31	38 900
			34	22 000
Mittelwerte:				18 300
37—27	42a	11 800	42a	17 500
	43b	17 400	43b	24 700
	41b	14 800	41b	26 400
	41a	12 900	41a	13 800
	40	12 700	40	12 600
	39	16 400	39	12 900
Mittelwerte:		14 300		18 000

Die errechneten Bildungswärmen für die hypothetische Acetylcholin-Zellverbindung in diesem Temperaturbereich betragen im Mittel etwa 19100 cal pro g-Molekül umgesetzter Substanz. Berücksichtigt man nur die im 10°-Intervall durchgeführten Versuche, die weniger starke Streuungen zeigen als die im 5°-Intervall vorgenommenen, so erhält man den mittleren Wert von etwa 16900 cal. Diese Wärmemenge ähnelt sehr der seinerzeit [3] für die hypothetische Acetylcholinverbindung des quergestreiften Muskels errechneten (16000 cal).

Man kann in ähnlicher Weise auch die U-Werte für die im Intervall 17—27° durchgeführten Versuche berechnen (s. Tab. 15).

Tabelle 15. — U-Werte.

Temperatur °C	Aufsetzversuche		Auswaschversuche	
	Versuch Nr.	Einzelwerte	Versuch Nr.	Einzelwerte
27—22	57a	— 19 900	45a	— 7 900
	57b	— 14 000	45b	— 50 100
	58a	9 700	46a	— 46 700
	58b	- 10 000	46b	- 9 500
Mittelwerte:		— 13 400		— 28 600
27—17	55a	— 18 600	44a	— 31 000
	55b	— 20 700	44b	— 25 800
	56a	— 23 700		
	56b	— 27 700		
Mittelwerte:		— 22 700		— 28 400

Da aber in diesem Intervall die Dissoziationskonstante umgekehrt mit steigender Temperatur kleiner wurde, der Bindungsprozeß also endotherm verlief, stellen die ermittelten U-Werte kein Maß für die freigewordene Wärmemenge, sondern für den Aufbrauch von Wärme dar.

Es ist unmöglich, daß ein und dieselbe Verbindung gleichzeitig eine exo- und eine endotherme sein kann. Die berechneten positiven und negativen Bildungswärmen können also unmöglich auf die hypothetische Pharmakon-Zellverbindung bezogen werden. Die durchgeführte Betrachtungsweise ist nur dann berechtigt, wenn die an die Acetylcholineinwirkung sich anschließende Reaktion des Organs den wärmeliefernden oder wärmeverbrauchenden Vorgang in sich trägt; dabei müßte notwendigerweise zwischen 17 und 27° ein anderer Vorgang dominieren als zwischen 27 und 37°.

Man wird mit Recht die Frage stellen, ob es überhaupt denkbar ist, daß ein und dasselbe Organ, insbesondere der isolierte glatte Muskel, je nach den Versuchsbedingungen seinen Kontraktionsvorgang einmal exo-, einmal endotherm ablaufen läßt. Obwohl diese Frage letzten Endes nur experimentell entschieden werden kann, ist es im vorliegenden Falle doch angebracht, sie zu diskutieren.

An dem von uns benutzten Testobjekt, dem isolierten Meerschweinchenuterus, sind Messungen über die Wärmeabgabe oder den Wärmeaufbrauch bei der Kontraktion unseres Wissens nicht durchgeführt worden. Es bleibt also nur übrig, die wenigen Messungen, die am glatten Muskel niederer Tiere angestellt wurden, zum Vergleich heranzuziehen. Dabei fanden

Snyder[13,14,15] und Bozler[16,17,18] die Kontraktion des glatten Muskels ähnlich wie die des quergestreiften mit Wärmebildung verknüpft und sowohl die Größe der Wärmebildung im ganzen, wie in den einzelnen Phasen des Kontraktionsvorgangs, der des quergestreiften Muskels entsprechend. Zieht man aus diesen Befunden die allgemeine Folgerung, daß auch beim glatten Muskel grundsätzlich der Kontraktionsvorgang als exothermer Prozeß abläuft, so werden nur die von uns im Intervall von 27–37° mit Acetylcholin erhaltenen Versuchsergebnisse verständlich. Unverständlich bleibt dagegen das Verhalten zwischen 17 und 27°, aus dem auf einen endothermen Vorgang geschlossen werden mußte. Es finden sich jedoch auch für die Möglichkeit eines solchen Verhaltens des glatten Muskels Hinweise in der Literatur. Sereni[19] fand Wärmeabsorption bei der Entlastung, Wärmeproduktion bei der Belastung des glatten Muskels in sehr frischem Zustand. Bethe[20] diskutiert die Möglichkeit, daß „in der Kontraktion des Muskels unter Umständen lediglich die Auslösung eines bestimmten Spannungszustandes zum Ausdruck kommt"; der eigentliche mit Wärmebildung verknüpfte Arbeitsvorgang wäre dann nicht die Kontraktion, sondern die Erschlaffung, die Kontraktionsphase aber könnte in Umkehrung dieses Prozesses mit Wärmeaufbrauch verbunden sein.

Unter diesen Gesichtspunkten kann auch die zweite Folgerung, zu der wir gezwungen waren, der Kontraktionsvorgang des isolierten Meerschweinchenuterus zwischen 17 und 27° laufe endotherm ab, diskutabel werden. Allerdings bereitet auch dann noch die Tatsache, daß ein und dasselbe Mittel in einem niederen Temperaturbereich einen endothermen, in einem höheren einen exothermen Kontraktionsablauf in Gang setzt, dem Verständnis Schwierigkeiten. Nach den bisher vorliegenden Versuchsergebnissen verschiedener Pharmaka am isolierten Meerschweinchenuterus könnte es sich um eine ganz besondere Eigentümlichkeit des Acetylcholins handeln. Lipschitz und Hsing[1] fanden nämlich unter der Einwirkung des Orasthins bei Temperatursteigerung eine stetige Erhöhung der Konzentrationswirkungskurve am Uterus. Rechnet man aus ihren Versuchen die Werte der Dissoziationskonstante einer hypothetischen Orasthin-Zellverbindung aus, so sinkt diese Konstante mit steigender Temperatur. Der Bindungsprozeß des Orasthins würde danach im gesamten Temperaturbereich von 19 bis 39° mit negativer Wärmetönung, folglich endotherm, verlaufen.

Es ist zu hoffen, daß man zu einer besseren Beurteilungsgrundlage gelangen wird, wenn der Ablauf der Kontraktion des isolierten Uterus in Abhängigkeit von Reizgröße und Temperatur mit einem andersartigen

[13] Snyder, Ch. D.: Amer. J. Physiol. **79**, 719 (1927). — [14] Snyder, Ch. D., u. F. W. Light jr.: Ebenda **86**, 399 (1928). — [15] Snyder, Ch. D.: Ebenda **92**, 117 (1930). — [16] Bozler, E.: Ebenda **90**, 295 (1929). — [17] Bozler, E.: J. Physiol. (Brit.) **69**, 442 (1930). — [18] Bozler, E.: Amer. J. Physiol. **101**, 13 (1932). — [19] Sereni, E.: Boll. Soc. Biol. sper. **1**, 481 (1926). — [20] Bethe, A.: Naturw. **18**, 678 (1930).

Reiz, als er in der Anwendung von Pharmaka gegeben ist, nämlich dem elektrischen Reiz, studiert wird. Derartige Versuche sind schon seit längerer Zeit im Gange.

Zusammenfassung.

Es wurde der Einfluß von Konzentration und Temperatur auf die Wirkung des Acetylcholins am isolierten, nicht pendelnden Meerschweinchenuterus, gemessen an der Veränderung der Latenzzeit, der Kontraktionsgeschwindigkeit, der Kontraktionsgröße und der Erschlaffungsgeschwindigkeit, untersucht.

1. Die Latenzzeit ist nur in geringem Maße konzentrationsabhängig, d. h.: mit sinkender Acetylcholinkonzentration steigen die Latenzzeiten nur wenig an. Der Temperaturkoeffizient Q_5 beträgt zwischen 37 und 17° 1,26—1,44; Q_{10} 1,44—2,08. Die Werte der Temperaturcharakteristik μ sind 7000—16000. Temperaturkoeffizienten und μ-Werte steigen mit sinkender Temperatur an.

Temperaturkoeffizient und Temperaturcharakteristik μ der Latenzzeit unter Acetylcholin am isolierten Uterus stimmen weitgehend mit entsprechenden am isolierten quergestreiften Froschmuskel (M. rect. abdom. von Rana temp.) zwischen 5 und 25° gefundenen Werten überein.

2. Die Kontraktionsgeschwindigkeit, ausgedrückt durch das Verhältnis Hubhöhe durch Zeit, steigt mit zunehmender Acetylcholinkonzentration. Der Temperaturkoeffizient Q_5 beträgt zwischen 37 und 17° 1,22—1,47; Q_{10} 1,61—2,16. Die Werte der Temperaturcharakteristik μ liegen zwischen 7500 und 14000. Man erhält die gleichen Zahlen, gleichgültig, ob man der Berechnung die Zeiten zugrunde legt, die bis zur Erreichung von 25 oder 50 oder 75 % der jeweiligen Endhöhe an Kontraktion vergehen. Temperaturkoeffizienten und μ-Werte gelten also für den ganzen Ablauf der Kontraktion, sie steigen wiederum, ähnlich wie bei den Latenzzeiten, mit sinkender Temperatur an.

Der Temperaturkoeffizient und die Temperaturcharakteristik μ der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Latenzzeit stimmen fast vollkommen untereinander überein.

3. Die Kontraktionsgröße erhöht sich zwischen 17 und 27° mit steigender Temperatur, zwischen 27 und 37° dagegen sinkt sie mit steigender Temperatur. Es wurde stets dasselbe Ergebnis erzielt, gleichgültig, ob die Endkonzentrationen durch wiederholte Zusätze von Acetylcholin, zwischen denen das Pharmakon jedesmal wieder weggewaschen wurde, geschaffen wurden (Auswaschversuche), oder durch schrittweisen Zusatz neuer Acetylcholinmengen jeweils in dem Augenblick, in welchem unter der vorhergehenden Konzentration die Endhöhe erreicht war (Aufsetzversuche). Auch die am gleichen Organ vorgenommenen Aufsetz- und Auswaschversuche bestätigten das Ergebnis, daß die Konzentrationswirkungskurve

des Acetylcholins beim Steigen von 17 auf 27° erhöht, bei weiterem Heraufgehen auf 37° erniedrigt wird.

Legt man der Beziehung von Konzentration (x) und Wirkung (y), ähnlich wie das am quergestreiften Muskel geschah, die Formel

$$xb - ya - xy = 0$$

zugrunde, so drückt sich der Einfluß steigender Temperatur zwischen 17 und 27° in einer Verkleinerung der Konstanten a, zwischen 27 und 37° in einer Vergrößerung der Konstanten a aus. Die physikalisch-chemische Deutung führt zu dem Schluß, daß der Kontraktionsablauf des isolierten Uterus unter Acetylcholin zwischen 17 und 27° endotherm, zwischen 27 und 37° exotherm vor sich gehen müßte. Die Wärmemengen, die demgemäß bei diesem Prozeß aufgenommen bzw. abgegeben würden, können unmöglich auf eine bestimmte Pharmakon-Zellverbindung bezogen werden; sie müßten vielmehr durch zwei verschiedene im Organ selbst liegende Reaktionsabläufe bedingt sein.

4. Die Erschlaffungsgeschwindigkeit des verschiedenen Acetylcholinkonzentrationen ausgesetzten Organs ist deutlich konzentrationsabhängig: je höher die angewandte und äußerlich fortbestehende Acetylcholinkonzentration ist, um so langsamer erfolgt die Erschlaffung. Bei höherer Temperatur ist die Erschlaffungsgeschwindigkeit größer als bei niedrigerer. Es ist unwahrscheinlich, daß in der Erschlaffung eine fortschreitende Hydrolyse des Acetylcholins zum Ausdruck kommt.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Arbeitsphysiologie Dortmund-Münster.)

Eine neue Methode der Dauerinfusion.

Von

E. A. Müller.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Dezember 1939.)

Die Dauerinfusion kleinster Flüssigkeitsmengen erfolgte bisher entweder aus Büretten mit Feinstellhähnen [P. Trendelenburg (1)] oder aus Injektionsspritzen mit motorisch langsam vorgetriebenen Spritzen-

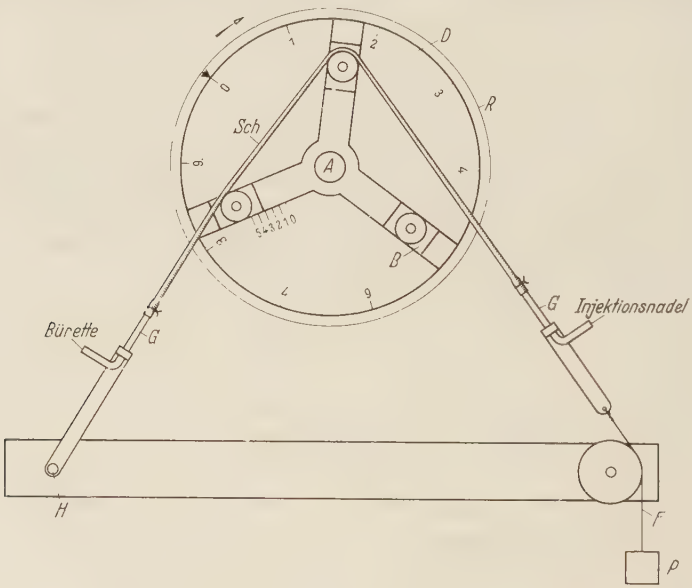


Abb. 1.

kolben [W. Straub (2)]. Bei der Verwendung von Büretten mit Feinstellhähnen ist die Injektionsmenge abhängig vom Druck in der Bürette und im Blutgefäß. Jener ist eventuell konstant zu halten, dieser dagegen nicht. Bei der Verwendung von Injektionsspritzen mit gut eingeschliffenen Kolben beeinflußt der Druck in den Gefäßen die Infusionsgeschwindigkeit nicht. Die für vielstündige Versuche notwendige Wahl großer Spritzen verbietet jedoch eine fortlaufende direkte Kontrolle der infundierten Menge. Die nachfolgend beschriebene Apparatur ermöglicht die Dauerinfusion beliebiger Flüssigkeitsmengen mit stufenlos regelbarer, vom Blutdruck unabhängiger Geschwindigkeit. Die infundierte Menge ist in jedem Zeitpunkt direkt abzulesen.

Die Apparatur verwendet das Prinzip der Rollenpumpe [Bayliss und Müller (3), E. A. Müller (4)] in Miniaturausführung (Abb. 1). Auf die Achse *A* eines Reduziergetriebes ist das Drehfutter *D* * aufgesetzt, dessen drei Backen *B* drei Achsen mit Rollen von 6 mm Durchmesser tragen. Durch Drehen des geriffelten Außenringes *R* läßt sich der radiale Abstand der Backen und damit der Rollenachsen zwischen 11 und 23 mm während des Betriebes stufenlos verstellen. Auf dem Außenring *R* und längs eines der Radialschlitze, in denen die Backen laufen, sind Teilungen angebracht, die den jeweiligen Radialabstand abzulesen gestatten. Der Radialabstand bestimmt die Geschwindigkeit, mit der die Rollen über den Schlauch *Sch* gleiten, und damit die Infusionsgeschwindigkeit. Der Schlauch *Sch* ist auf zwei Glasröhrchen *G* aufgezogen. Das eine Röhrchen hängt mit einer Drahtschlinge an dem Haken *H*, das andere ist über eine Drahtschlinge und den über eine Rolle laufenden Faden *F* mit Gewichten *P* belastet. Auf diese Weise ist die Spannung des Schlauches unabhängig von der Rollenstellung konstant. Das Glasröhrchen auf der Ansaugseite ist mit einer 5 ccm Mikrobürette verbunden, die aus einem Seitenstutzen mit Hahn und Vorratsgefäß nachgefüllt werden kann und die eine direkte Kontrolle der infundierten Mengen bis zu 0,005 ccm genau ermöglicht. Bei nahezu waagerechter Lage der Bürette ist die Infusionsgeschwindigkeit von der Füllung der Bürette unabhängig. Das Röhrchen auf der Pumpseite steht mit der Injektionsnadel oder -kanüle in Verbindung. Die Verbindungsschläuche Bürette-Pumpe und Pumpe-Injektionsnadel dürfen höchstens 1 mm Lumen bei 1,5 mm Wandstärke besitzen, damit ihre Füllung mit dem Innendruck möglichst wenig schwankt. Das Getriebe wurde so gewählt, daß die Achse *A* beim Antrieb mit einem kleinen 100tourigen Synchronmotor 1 Umdrehung/Min. machte. Die kleinsten im Handel erhältlichen dünnwandigen Schläuche sind die Radfahrventilschläuche (1,5 mm Durchmesser, 0,7 mm Wandstärke). Mit diesem wurden folgende Infusionsgeschwindigkeiten erhalten (Tabelle 1):

Tabelle 1.

Radialer Abstand der Rollenachsen mm	Infusion ccm pro Min.	
	$P = 0{,}4$ kg	$P = 0{,}6$ kg
11	0,019	0,012
23	0,060	0,042

Bei der größeren Belastung ist der Schlauch gedehnter und daher enger. Dabei werden die Infusionsleistungen niedriger. Bei konstanter Umdrehungszahl der Achse *A* ist also durch Änderung der Belastung und des radialen Rollenabstandes die Infusionsgeschwindigkeit im Verhältnis 1 : 5 stufenlos regelbar. Weitere Variationen erhält man durch Änderung der Umdrehungszahl von *A*, eventuell mit Hilfe eines Stufengetriebes nach Art der Anordnung von W. Straub (2). Da man ja auch die Schlauchweite und die Konzentration der Infusionslösung ändern kann, ist man praktisch jeder Infusionsaufgabe gewachsen.

* Universal Dreh- und Bohrfutter Nr. 44c der Fa. Lorch, Schmidt u. Co., Frankfurt a. M.

Zur Infusion gegen hohe Drucke nimmt man zweckmäßig kräftigeren Schlauch (1 mm Durchmesser, 1,5 mm Wandstärke), den man mit 1 kg belastet. Unter diesen Bedingungen wird die Infusionsgeschwindigkeit durch Drucke bis zu 200 mm Hg nicht beeinflußt.

Die Stetigkeit der Infusionsgeschwindigkeit in langen Zeiträumen ist groß, wenn man wenigstens drei Stunden vor Verwendung der Pumpe den Schlauch *Sch* mit der Infusionslösung füllt, damit er einen konstanten Feuchtigkeitsgehalt annimmt. In aufeinanderfolgenden Stunden wurden gemessen: 1,19, 1,18, 1,15, 1,14, 1,15, 1,16, 1,17, 1,17 ccm und ein anderes Mal: 3,58, 3,58, 3,58, 3,59, 3,58 ccm. Die Stetigkeit in kleinsten Zeitabschnitten leidet darunter, daß beim Abheben der Rollen vom Schlauch auf der Infusionsseite der Schlauch sich erweitert. Dadurch tritt eine Unterbrechung der Infusion ein, die vom Schlauchquerschnitt und vom Rollendurchmesser abhängt. Je kleiner der Querschnitt und je größer die Geschwindigkeit der Rollenbewegung auf dem Schlauch ist, desto kleiner wird dieser Fehler und desto stetiger wird die Infusion auch innerhalb jeder einzelnen Minute. In Abb. 2 wurde mit einem Miniaturspirometer (12,7 mm Ausschlag für 0,1 ccm Füllung) für drei verschiedene Infusionsgeschwindigkeiten die Infusion als Funktion der Zeit registriert. Die Kurven zeigen, daß selbst in kleineren Zeitabschnitten als Minuten konstante Mengen infundiert werden.

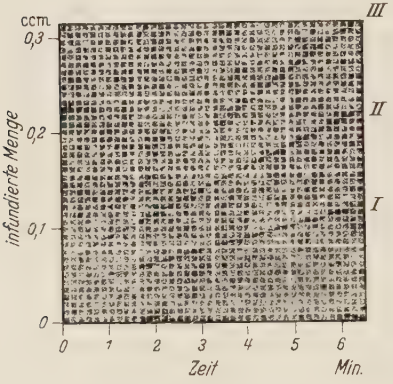


Abb. 2.
I = 0,0125 ccm/min; II = 0,023 ccm pro Min; III = 0,032 ccm pro Min. Schlauch: 1,5 mm ∅, 0,7 mm Wandstärke. Belastung 500 g. 3 Rollen gleiten in 1 Minute über den Schlauch.

Zusammenfassung.

Eine Mikro-Rollenpumpe wird beschrieben, die bei direkter Kontrolle der infundierten Mengen (Ablesegenauigkeit: 0,005 ccm) beliebige Infusionsgeschwindigkeiten über beliebige Zeiten gegen wechselnde Drucke konstant zu halten ermöglicht. Bei konstanter Motordrehzahl ist jede gewählte Größenordnung der Infusionsgeschwindigkeit durch Änderung des radialen Rollenabstandes und der Schlauchspannung im Verhältnis 1 : 5 während des Betriebes stufenlos regelbar.

Literatur.

1) Trendelenburg, P.: Pflügers Arch. **203**, 413 (1924). — 2) Straub, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 456 (1937). — 3) Bayliss u. E. A. Müller: J. of scientific instruments V, 278 (1928). — 4) Müller, E. A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 492 (1937).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Nikotin und die Diätetik des Tabakrauchens.

Von

W. Straub und **August Amann.**

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Dezember 1939.)

Über die toxikologische Topographie und den Wirkungswert des Nikotins ist zwar viel bekannt, über die Kinetik und die damit zusammenhängende Diätetik dieses Genußgiftes noch recht wenig, und doch ist dies der Kernpunkt der Würdigung des Nikotins als Genußgift. Die folgende Mitteilung soll hier Klärung bringen.

Tödliche Dosen von Nikotin bei verschiedenen Bedingungen der Einverleibung.

Alle Versuche wurden an Katzen ausgeführt, die mit 70 mg/kg Chloralose narkotisiert waren. Der Blutdruck aus der Carotis und manchmal auch die Atmung wurden registriert.

Wenn man Nikotin rasch intravenös in die Jugularis injiziert, so liegt die D.l.m. zwischen 1.3 und 1.5 mg/kg, ein Wert, der sich hinreichend mit dem früher von D. Macht[1] festgestellten deckt. Der Tod tritt kritisch und scharf wenige Minuten nach der Einverleibung durch eine Atemlähmung ein.

Wenn man den Blutgehalt der Katze zu 7% des Körpergewichts annimmt, so wäre also bei der intravenösen Injektion von 1,5 mg/kg Nikotin mindestens einen Augenblick lang die Nikotinkonzentration des Blutes ungefähr 1 : 50000.

Ermittelt man die tödliche Dosis am nicht künstlich respirierten Tiere, so ergibt sich, daß die absolute Dosengröße mit zunehmender Infusionsdauer wächst. Wir haben immer eine 0,5%ige Nikotinlösung infundiert und folgende Werte erhalten:

Tabelle 1.

Nr.	Nikotin mg/kg/Std.	Infusionsdauer Min.	Absolute Menge mg	Bemerkung
1	1,15	551	10,55	lebt
2	2,10	242	8,71	tot
3	2,50	159	6,74	„
4	3,10	116	5,93	„
5	7,10	44	5,21	„

[1] J. Pharmacol. (Am.) **50**, 93—99 (1934).

Wenn man diese Lösung mit der Geschwindigkeit von 1,15 mg/kg/Std. infundiert, so überlebt das Tier auch dann noch, wenn man im ganzen die achtfache D.l.m. verwendet hat. Diese Geschwindigkeit stellt also das eine Extrem dar. Andererseits fanden wir bei Verwendung von 7,1 mg/kg/Std. eine Infusionsdauer von 44 Minuten. Die bei der jeweiligen Geschwindigkeit insgesamt benötigten Giftmengen sind auch in den Zwischenwerten immer noch wesentlich größer als die D.l.m. bei der maximalen Geschwindigkeit einer intravenösen Injektion. Die Endpunkte der Infusionen mit verschiedener Geschwindigkeit sind ebenfalls die scharfen Momente der Atemlähmung. Dieses natürliche Ende einer Nikotineinverleibung kann sehr hinausgezogen werden, wenn man das Tier künstlich respiriert. So konnten wir unter solchen Umständen bis zu 42 mg/kg bis zum Tode dem Tier infundieren. Vergleicht man die absoluten Werte der bis zum Atemstillstand eingeflossenen Menge, so sind sie untereinander ziemlich gleich, d. h. im Mittel 6,63 mg/kg, wiewohl die Infusionszeiten variieren zwischen 44 und 242 Minuten. Da andererseits bei der momentanen Injektion zum gleichen Effekt 1,5 mg/kg nötig sind, ist anzunehmen, daß die gleiche absolute Menge zum gleichen Effekt bei der langsamen Infusion ebenfalls die effektive Dosis ist, d. h. daß das Atemzentrum bei einer beispielsweise 242 Minuten dauernden Infusion einer 0,5%igen Nikotinlösung ebenfalls mit 1,5 mg/kg stirbt und nicht von jener achtfachen, tatsächlich eingeflossenen Menge. Es muß demnach, je langsamer die Infusion verläuft, desto mehr Nikotin verschwinden, sei es durch Zerstörung oder durch Ausscheidung. Nach neueren Untersuchungen (Bodnàr, J. Vitez, Ladislaus Nagy und Alex. Dickmann[2]) am Menschen ist jetzt anzunehmen, daß eine merkliche Nikotinausscheidung nicht stattfindet. Es bleibt also nur übrig anzunehmen, daß ein der Wirkung entgegengesetzter Prozeß im Blute stattfindet (wahrscheinlich Zerstörungsprozeß). Der Organismus hat demnach Einrichtungen, mit den vielfachen D.l.m. der Einzelinjektion fertig zu werden, sofern man ihm nur Zeit dazu läßt. Nach den oben zitierten Untersuchungen von Bodnàr usw.[2] hat eine Versuchsperson nacheinander 24 Zigaretten geraucht und dabei insgesamt 224 mg Nikotin resorbiert. Nach allgemeinen Angaben soll die D.l.m. von Nikotin für den Menschen, rasch resorbiert, etwa 50 mg betragen. Die obengenannte Versuchsperson ist demnach mit dem 4,5fachen der tödlichen Menschendosis fertig geworden.

Nach den gleichen Autoren (l. c.) werden aus einer Zigarette 5—6 mg Nikotin resorbiert. Da bekanntlich die Resorption durch die Rachen-, Mund- und Nasenschleimhaut nicht nur sehr gut, sondern auch sehr rasch vor sich geht, scheinen wir berechtigt, diese Werte des Rauchens mit unseren intravenösen Dauerinfusionen in Vergleich zu bringen.

[2] Biochem. Z. **276**, 317 (1935).

Wenn man also die Ergebnisse unserer Infusionsversuche ins Menschliche überträgt, so ist die Resorptionsgröße und damit der Effekt des gerauchten Nikotins ganz die Funktion der Geschwindigkeit des Rauchens, natürlich nur hinsichtlich der akuten Wirkungen des Nikotins, und dies dürfte der Kernpunkt unseres Problems überhaupt sein.

Nebenwirkungen der akuten Nikotinvergiftung.

Wenn man die sicher tödliche Dosis von 2,0 mg/kg auf einmal intravenös injiziert, so treten immer die Erscheinungen der Abb. 1 auf, d. h.

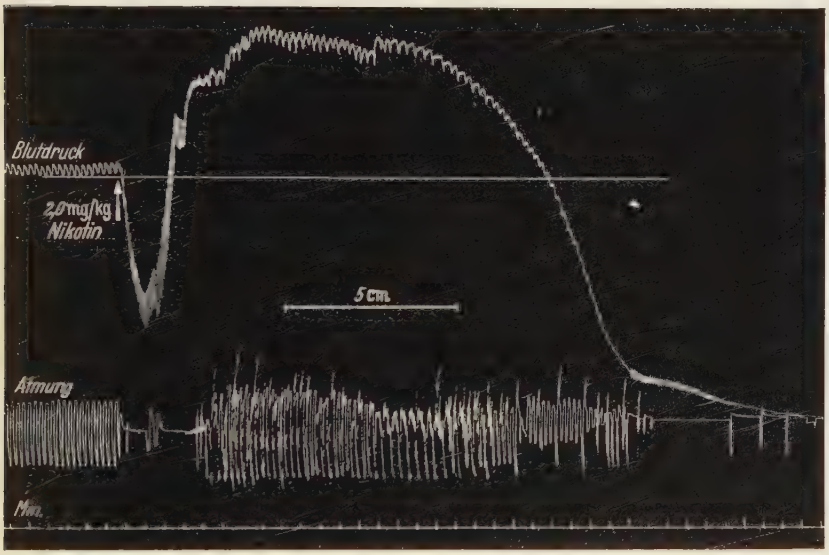


Abb. 1. Wirkung von 2,0 mg Nikotin pro kg Katze. Obere Kurve Blutdruck, untere Atmung.

eine sofortige Blutdrucksenkung durch Vagusreizung, die sehr tief geht, aber rasch in eine Blutdrucksteigerung beträchtlicher Höhe umschlägt. Die Steigerung des Blutdrucks hält viel länger an als die vorhergehende Senkung. Sie kann bis zu mehreren Minuten anhalten, schlägt aber dann in eine abermalige Blutdrucksenkung bis zur Aufhebung des Kreislaufs um. Die gleichzeitig registrierte Atmung steht während der initialen Blutdrucksenkung einen Moment still, beginnt wieder während der Blutdrucksteigerung, wird aber bald, und zwar bei noch ausreichendem Kreislauf schlecht, und versagt schließlich.

Wenn man statt der Injektion eine Infusion der 0,5%igen Nikotinlösung vornimmt, so kann man bei allen tödlichen Infusionsgeschwindigkeiten diese Initialwirkungen feststellen, z. B. zeigt Abb. 2 den Effekt einer Infusion von 3,067 mg/kg/Std. Nikotin, bei der der initiale Vagus-

effekt sehr klein, die Blutdrucksteigerung aber noch voll erhalten ist. Erst mit nichttödlichen Dosen, z. B. 1,149 mg/kg/Std. kann man sich so einschleichen, daß diese initialen Erscheinungen ganz ausbleiben (Abb. 3). Man kann überhaupt sagen, daß diese Überfallserscheinungen mit der

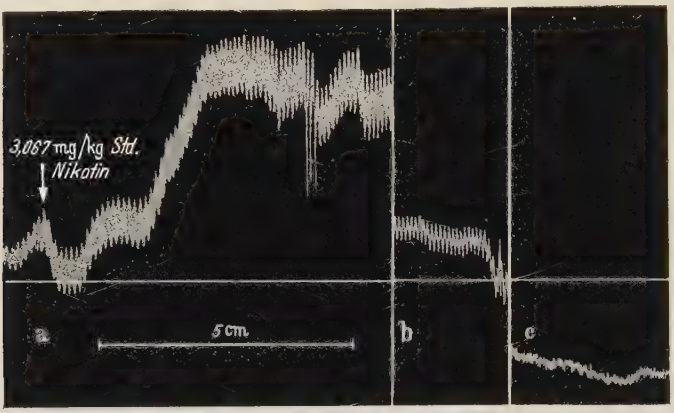


Abb. 2. Dauerinfusion von 3,067 mg/kg/Std. Nikotin. a) Beginn der Infusion. b) 20 Minuten später. c) 80 Minuten später.

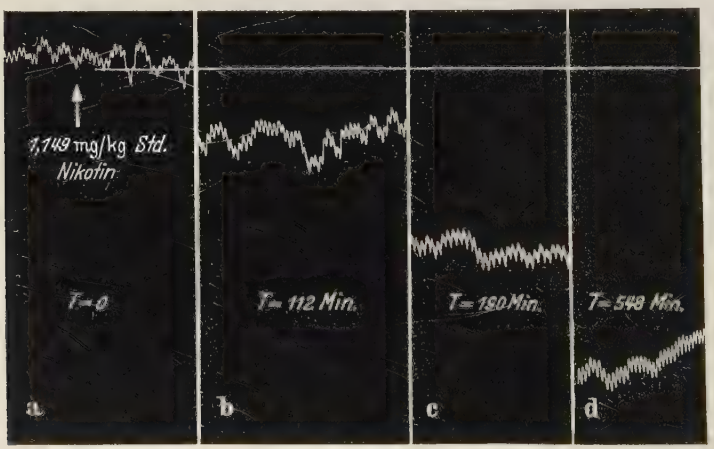


Abb. 3. Dauerinfusion von 1,149 mg/kg/Std. Nikotin, nicht tödlich, nur fortdauernde Blutdrucksenkung. a) Unmittelbar nach Beginn der Infusion. b) 112 Minuten später. c) Nach 190 Minuten. d) Nach 548 Minuten.

Langsamkeit der Infusion abnehmen, und vermuten, daß dies auch auf die Vorgänge beim Tabakrauchen zu übertragen ist.

Zur Analyse dieser Erscheinungen wurden einige Antagonismen geprüft. Z. B. ergab sich (Abb. 4), daß durch vorherige Behandlung mit Atropin die initiale Blutdrucksenkung total verschwindet, die nachfolgende Blutdrucksteigerung aber unverändert bleibt. Letztere dürfte demnach

kaum eine parasympathische Reizung sein. Sie ist aber auch wahrscheinlich nicht Effekt einer sympathischen Gefäßwirkung, denn sie weicht nicht einer vorherigen Behandlung mit Ergotamin, die sich vorher gegen Adrenalin als wirksam erwies (Abb. 5).

Vom Yohimbin wird angenommen, daß es ähnlich wie Ergotamin Sympathikusenden lähmt. In besonderen Versuchen, deren Belegung durch Abbildungen sich erübrigt, konnte die Vorbehandlung

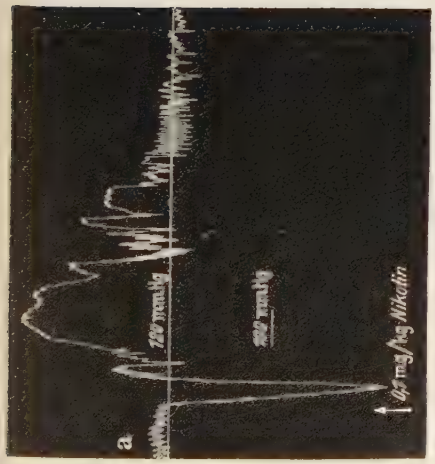


Abb. 4. Einzelinjektion von 0,1 mg/kg Nikotin. a) Normalzustand. b) Nach 1,0 mg/kg Atropin. In b) erste Marke = Atropininjektion, zweite Marke = 5 γ Acetylcholin, dritte Marke = 0,1 mg/kg Nikotin. Das Ausbleiben der Wirkung von Acetylcholin beweist die Wirksamkeit der Atropininjektion.

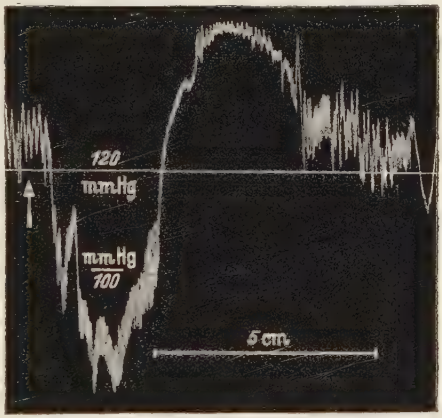


Abb. 5. Einzelinjektion von 0,1 mg/kg Nikotin nach 0,9 mg/kg Ergotamin.

mit Yohimbin die Blutdrucksteigerung durch Nikotin nicht verhindern.

Antagonismen haben bekanntlich für die Deutung von Vergiftungserscheinungen nur problematischen Wert. Es stecken zu viele quantitative Fragen darin, und besonders scheint uns ein Ausbleiben von Wirkungen wenig kausalen Deutungswert zu haben.

Nikotin und Hochdruck.

In der Äthiologie des Hochdrucks wird gerne dem Rauchen, oder wie man als selbstverständlich annimmt dem Nikotin, ein wesentlicher Anteil

an Kausalität in die Schuhe geschoben, insbesondere seit am ganzen Tier gefunden wurde, daß das Nikotin Adrenalin aus der Nebenniere ausschüttet (W. B. Cannon[3], Fr. Eichholtz[4]). Anitschkow[5] konnte diese Tatsache an der ausgeschnittenen Nebenniere in einer Anordnung: Starlingsches Herz-, Lungen und Nebennierenpräparat reproduzieren. Er fand, daß Nikotinkonzentrationen zwischen 1:25000 und 1:1 Million der Blutmenge zugesetzt Adrenalin ausschütteten. Wenn auch der rechnerische Anschluß dieser Anitschkowschen Werte an die Nikotinwerte unserer Dauerinfusionen kaum möglich ist, so ist doch zu sagen, daß die in unseren Versuchen beobachtete Blutdrucksteigerung die initiale Wirkung

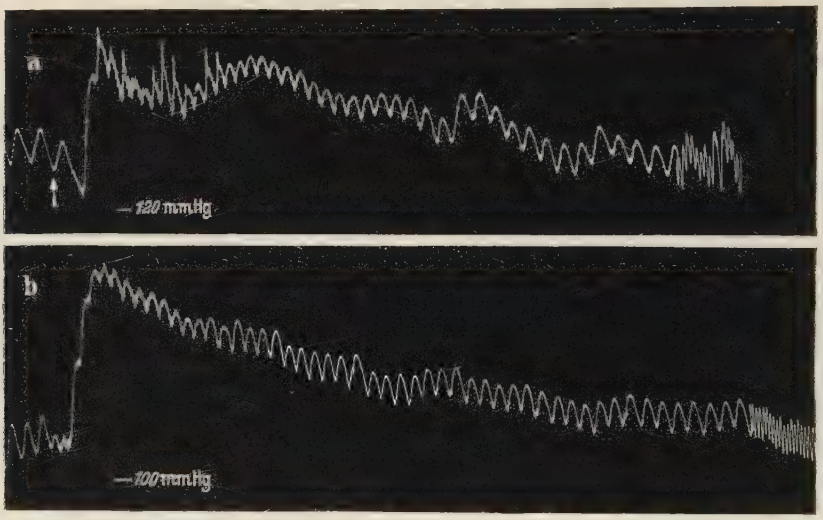


Abb. 6. a) Injektion von 0,1 mg/kg Nikotin vor Exstirpation der Nebennieren; b) dieselbe Menge am selben Tier unmittelbar nach Exstirpation beider Nebennieren.

einer tödlichen Nikotinvergiftung ist, bei der man mit einer Nikotinkonzentration von etwa 1:50000 im Blut zu rechnen hat, wie sie beim Tabakrauchen wohl nie erreicht wird. Im Laufe der Nikotinwirkung sinkt aber der Blutdruck ab, und es ist den Kurven nicht anzusehen, wieviel etwa Adrenalinwirkung in ihnen enthalten sein kann. Ferner ist zu bemerken, daß zur Erzeugung eines Hochdrucks wohl eine kontinuierliche Adrenalin-Dauersekretion zu erwarten wäre und nicht ein einzelner Stoß, wie offenbar bei Anitschkows Beobachtungen. Um extreme Verhältnisse zu schaffen, haben wir Nikotin in nebennierenlose Tiere infundiert. Die Nikotinwirkung war mit und ohne Nebennieren die gleiche (Abb. 6).

[3] J. Pharmacol. (Am.) **3**, 379 (1912). — [4] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **99**, 172 (1923). — [5] Ebenda **137**, 180 (1928).

Kürzlich ist von W. Straub und K. Stefánsson[6] (siehe auch G. Vogeler[7]) festgestellt worden, daß ein funktioneller Antagonismus zwischen Adrenalin und Ferroeisen besteht. Wir haben ihn zur Klärung unserer Frage herangezogen. Es wurde zu verschiedenen Zeiten der Nikotinwirkung bei Dauerinfusionen, und zwar sowohl im Stadium einer deutlichen Blutdrucksteigerung als auch später eine Infusion von Ferrobicarbonat von erprobter Konzentration durchgeführt. Aus der Arbeit von W. Straub und K. Stefánsson ist zu entnehmen, daß ein durch Dauerinfusion von

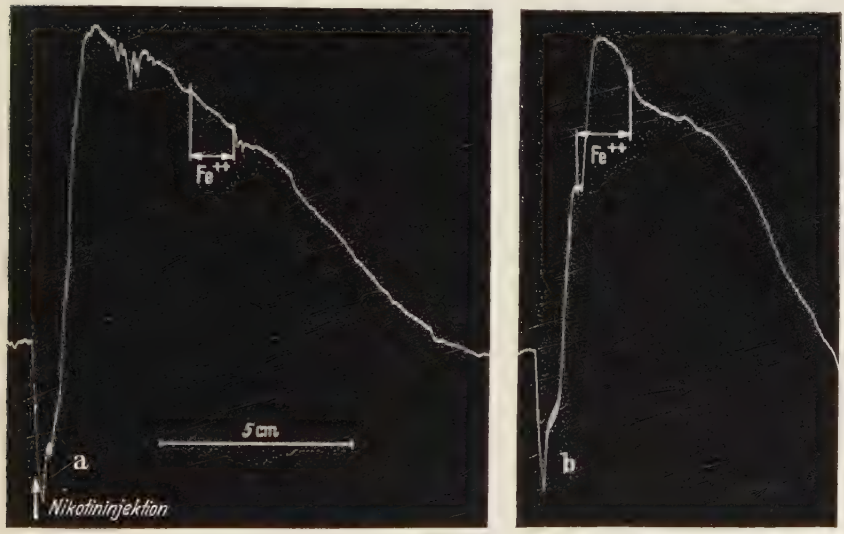


Abb. 7. Zwei Injektionen von Nikotin und zwei Infusionen von Ferrobicarbonat in verschiedenen Stadien der Nikotinwirkung.

Adrenalin hervorgerufener oder unterhaltener Hochdruck sofort durch die Ferrosalzinfusion unterbrochen wird (Abb. 2 bei W. Straub und K. Stefánsson). In unseren Nikotinversuchen trat nun niemals eine Deformation der Blutdruckkurve auf, wenn Ferroeisen gegeben wurde (Abb. 7). Da die Ferroreaktion eine außerordentlich empfindliche ist, kann man wohl annehmen, daß im Bereiche unserer erträglichen und nicht tödlichen Nikotininfusionen keine Adrenalinausschüttung vorhanden ist.

Nikotin und Vagus.

Daß Nikotin bei Einzelinjektionen im Vagusgebiet reizt und lähmt, ist lange bekannt. Es ist aber auch bekannt, daß die Vaguslähmung am Herzen durch Nikotin weit entfernt ist von der Spezifität etwa der Atropinwirkung.

[6] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 269 (1940). — [7] Ebenda **194**, 281 (1940).

Wenn man am durchschnittenen Vagus einer Katze unter Bestehen einer Dauerinfusion von Nikotin in einem früheren Stadium des Nikotineinflusses den Vagus reizt, bekommt man meistens den Effekt wie in Abb. 8, d. h. eine echte Blutdrucksenkung und merkwürdigerweise darauf eine steile Blutdruckerhöhung. Die ganze Erscheinung macht den Eindruck wie das zusammengestauchte Bild der Wirkung einer Nikotineinzelinjektion (siehe Abb. 1).

Abb. 8. Elektrische Vagusreizung im Anfangsstadium einer Nikotin-Dauerinfusion.

Wenn man längere Zeit hindurch die Dauerinfusion vornimmt und die Reizbarkeit des nicht durchschnittenen Vagus von Zeit zu Zeit prüft, so bekommt man Erscheinungen wie in Abb. 9, d. h. die Abwärtszacke der Vagusreizung verschwindet vollständig, auch die Aufwärtszacke ist sehr klein. Das Maximalstadium der Lähmung wurde mit 5,25 mg Nikotin erreicht. Es ist nun bemerkenswert, daß nach dem Absetzen der Nikotininfusion die elektrische Reizung des Vagus unwirksam wurde, wobei besonders auffällt, daß die positive Phase dieser Reizwirkung auch weit in die Erholung aus der Nikotinvergiftung hinein zunahm. Dies legte die Vermutung nahe, daß die für die reine Vaguswirkung paradoxe Blutdrucksteigerung Effekt einer Mitreizung des Depressors ist. Dies wurde des weiteren untersucht.

Nikotin und Depressor.

Technik.

Der Depressor verläuft bei der Katze gemeinsam mit dem Vagus. Er ist bekanntlich ein rein zentripetal leitender Nerv. Wenn man den Vagus der Katze etwa in der Mitte des Halses durchschneidet und den zentralen Stumpf reizt, bekommt man eine reine Depressorwirkung, d. h. ein Absinken des Blutdrucks auf reflektorischem Wege in der bekannten Weise (siehe besonders Eberhard Koch[8] und W. M. Bayliss[9]). In unseren Versuchen hatten wir außerdem den anderen Vagus durchschnitten und nicht mit Elektroden armiert. Die eine Carotis führte zum Blutdruck-

[8] Koch, Eb.: Die reflektorische Selbststeuerung des Kreislaufs, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig 1931. — [9] Bayliss, W. M.: The Vaso-Motor-System, Monographs on Physiology Langmans, Green and Co., London.

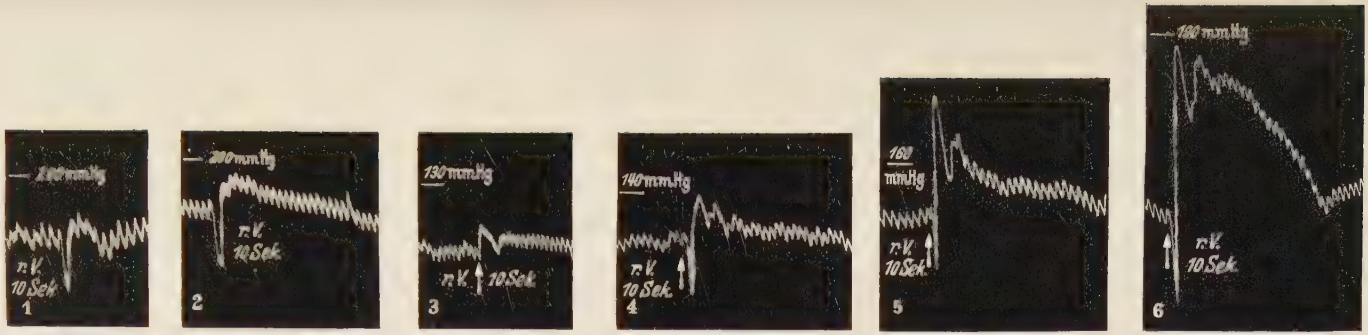


Abb. 9. Reizbarkeit des undurchschnittenen Vagus vor, während und nach einer Nikotin-Dauerinfusion. — 1. Normalzustand; 2. Nikotinzustand nach Einlauf von 2,27 mg Nikotin; 3. nach 5,25 mg Nikotin; 4. 77 Minuten nach Absetzen des Nikotin-Einfließens; 5. 106 Minuten später; 6. 157 Minuten später.

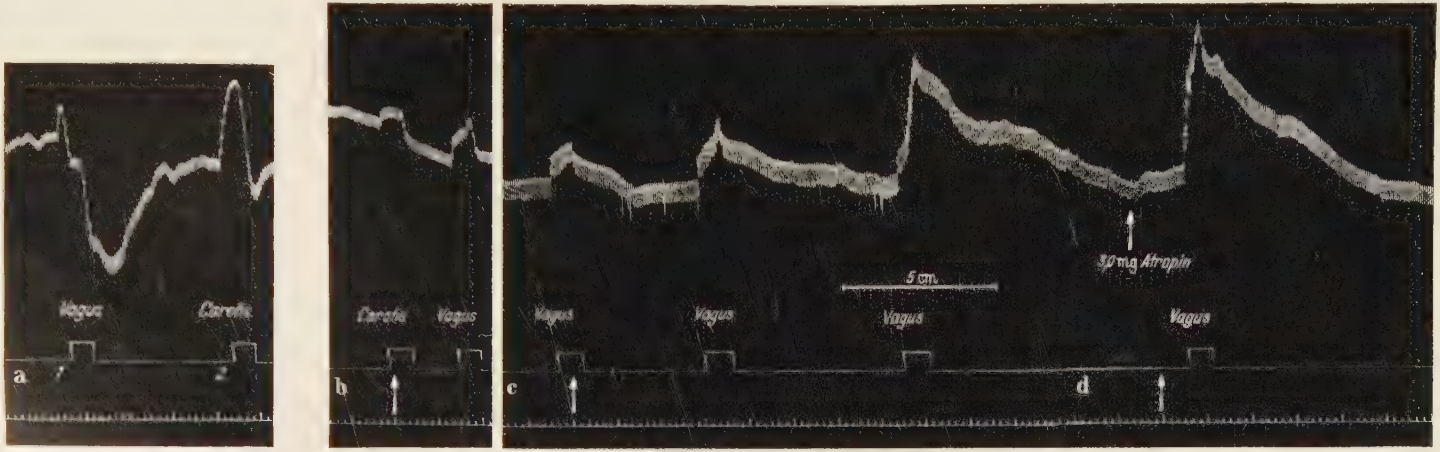


Abb. 10a. Normalzustand. Katze von 3,8 kg Gewicht. Rechter und linker Vagus durchschnitten. Elektroden am zentralen Ende des rechten Vagus. Blutdruck aus der linken Carotis, rechte Carotis angeschlungen. — 1. Vagusreizung; 2. Carotiskompression. — Abb. 10b. Dasselbe nach Einfluß von 2,03 mg Nikotin. — Abb. 10c. Fortsetzung, nach Einfluß von 5,08 mg Nikotin. Abb. 10d. Vorbehandlung mit 3,0 mg Atropin – ohne Wirkung –, insgesamt 9,16 mg Nikotin eingeflossen.

manometer, die andere war frei präpariert. Sie diente aus anderen Gründen zur Prüfung des Kompressionsreflexes auf den Blutdruck.

Über die Einwirkung von Giften auf den Depressor ist in der Literatur schon allerlei mitgeteilt (siehe Eberhard Koch[8], W. M. Bayliss[9]). Auch für das Nikotin ist angegeben worden, daß der Depressormechanismus gelähmt würde. Bei diesen Versuchen mit Giften im Depressorexperiment ist allerdings der Selbstzweck der Depressor gewesen, während in unseren Versuchen das Nikotin Selbstzweck sein sollte. Deshalb haben wir das Nikotin unter Dauerinfusion einfließen lassen, um auf einem sicheren, zahlenmäßig definierbaren Boden der Giftwirkung zu stehen. In Abb. 10a—d ist das Resultat der Nikotinwirkung auf den Depressor mitgeteilt, das gesetzmäßig zu sein scheint und jedenfalls in unserer Untersuchungsreihe durch keine Ausnahme beeinträchtigt war. Abb. 10a ist der Effekt einer Depressorreizung mit einer dauernd beibehaltenen Reizintensität von 1—5 Milliampère eines Schwingungskreises, Abb. 10b der entgegengesetzt wirksame Effekt einer Aortenkompression. Kurze Zeit nach der Infusion einer mäßigen Nikotinkonzentration verschwindet, wie schon bekannt, der Depressorreflex, nebenbei bemerkt nimmt auch der Aortendruckreflex ab, die Ausschläge in der Kurve nehmen mehr und mehr ab, gehen dann durch einen Indifferenzpunkt und werden wieder positiv, und zwar wie Abb. 10c zeigt, sehr stark positiv, etwa so stark positiv, wie vorher negativ. Es sind das Erscheinungen, die atropinunempfindlich sind, wie in Abb. 10d die Injektion von 3 mg Atropin. Daß eine derartige Umkehr im Depressorgebiet stattfinden kann, er vielleicht dazu neigt, hat W. M. Bayliss[9] für das Strychnin schon nachgewiesen. Hier zeigt es sich auch für das Nikotin.

Im Programm unserer Untersuchung stand besonders das Quantitative des Giftverbrauchs. In dem mitgeteilten Versuch waren im Moment der eben vollzogenen Umkehr des Reflexes 2,03 mg/kg Nikotin eingeflossen. Es ist anzunehmen, daß ein abschwächender Effekt auf diesen Reflex schon von viel kleineren Dosen erzielt wird. Die maximale Umkehr war bei 5,08 mg/kg eingetreten. In mehreren anderen Versuchen haben wir nach dem Beginn der Umkehr der Depressorwirkung nach Nikotin gefahndet und gefunden, daß sie schon durch 1,14 mg/kg Nikotin erzielt wurde.

Es ergibt sich also, daß der Depressor, der bekanntlich ein sehr sensitiver und fein abgestufter Regler des Blutdrucks ist, schon von so kleinen Mengen Nikotin gestört wird, wie sie beim Rauchen bestimmt vorhanden sind. Denn schon eine Zigarette schickt ja (siehe oben) ungefähr 6 mg Nikotin in den Organismus des Rauchers. Vielleicht könnte auf diesem Wege das Nikotin in der Pathologie des Rauchens eine Rolle spielen.

Zusammenfassung.

1. Bei intravenöser Dauerinfusion des Nikotins ist die tödliche Dosis um so größer, je langsamer die Infusion verläuft, bei gleicher Konzentration der einfließenden Menge.

2. Es ist nicht wahrscheinlich, daß die durch Nikotin bewirkte Ausschüttung von Adrenalin aus der Nebenniere bei den Erscheinungen des Hochdrucks eine kausale Rolle spielt.

3. Dagegen stört das Nikotin die Blutdruckregelung durch den Depressor. Der Depressorreflex wird erst abgeschwächt und dann umgekehrt.

4. Die so erzielte Regulationsentgleisung unter Nikotin erfolgt von Dosen Nikotin, die auch beim Rauchen zur Verfügung stehen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Die Beeinflussung der Cholinesterase des Blutserums durch Cholesterin.

Von

Fritz Zinnitz.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Dezember 1939.)

Aus Versuchen mit Ganzfröschen und Spinalfröschen konnte ich in einer früheren Arbeit[1] zeigen, daß Cholesterin die Acetylcholinwirkung aufheben kann. Die Veränderungen der Acetylcholinwirkung unter Cholesterin wurden damals am Verlauf der Herztätigkeit, die mit der Suspensionsmethode nach Engelmann graphisch registriert wurde, beobachtet. Es zeigte sich, daß es trotz hoher Acetylcholindosen unter der Cholesterinwirkung weder zum diastolischen Herzstillstand, noch zu einer ausgeprägten Bradykardie kommt, sondern allein zu einer für die Acetylcholinwirkung atypischen Hebung der Fußpunkte ohne Senkung der Gipfelpunkte, die auf eine systolische Kontrakturbereitschaft der Kammer hindeutet. Als Erklärung für diesen Vorgang wurde damals eine Hemmung der Esterasewirkung, die den Verseifungsprozeß, der Träger der Acetylcholinwirkung ist, in starkem Maße beeinflußt, angenommen. Denn Acetylcholin als Potentialstoff im Sinne Straubs wirkt nicht durch die absolute Menge, die dem Versuchstier zugeführt wird, sondern durch das bei der Acetylcholinverseifung am Wirkungsort sich bildende Konzentrationspotentialgefälle. Ist dort gleichzeitig eine große Menge von Acetylcholin und von Cholinesterase vorhanden, dann kommt es zum Entstehen eines hohen Acetylcholinkonzentrationspotentialgefälles, das in einer starken Intensität der Acetylcholinwirkung zum Ausdruck kommt, und zu einem schnellen Vergehen der Acetylcholinwirkung, da die große zum Abbau der Wirkung zur Verfügung stehende Esterasemenge den Verseifungsprozeß beschleunigt. Umgekehrt kann bei wenig vorhandenem Acetylcholin und geringer Esterasemenge nur ein niedriges Potentialgefälle mit schwacher Acetylcholinwirkung entstehen.

Wird nun unter der Wirkung von Cholesterin die Fermenttätigkeit der Esterase beschränkt, dann wird das Acetylcholinpotentialgefälle gesenkt und damit die Intensität der Acetylcholinwirkung vermindert. Außerdem verlangsamt sich durch die Einschränkung der Fermentwirkung die Acetylcholinverseifungsgeschwindigkeit, was sich zugunsten einer

[1] Zinnitz, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 697 (1938).

Verlängerung der Wirkungsdauer auswirkt. Die damaligen Versuche zeigen, daß es mit Hilfe der Cholesterinwirkung zu einer vollständigen Blockade der Esterase kommen kann, bei der jegliche fermentative Tätigkeit der Cholinesterase gesperrt wird, so daß ein wirksames Acetylcholinpotentialgefälle überhaupt nicht mehr entstehen kann und das zugeführte Acetylcholin darum wirkungslos bleiben muß.

Von diesen Voraussetzungen ausgehend kam ich zu der Annahme, daß auch im Organismus des Warmblüters unter dem Einfluß von Cholesterin eine Hemmung der Esterasewirkung stattfinden müßte. Als Nachweis hierfür wurde die Esterasekonzentration im Blutserum von Katzen untersucht. Die Versuche wurden so durchgeführt, daß den Tieren das Cholesterin entweder als Dauerinfusion direkt in die Blutbahn zugeführt wurde oder intramuskulär, intrapleural und intraperitoneal injiziert wurde. Zur Dauerinfusion wurde Cholesterinozonid[2], eine als Schutzkolloid stabilisierte neutrale Emulsion von 1,9%igem Cholesteringehalt, verwendet, während bei intramuskulärer, intrapleuraler und intraperitonealer Applikation eine 1%ige Cholesterinacetat- und Cholesterinolivenöllösung gebraucht wurde. Acetat und Ozonid sind dabei lediglich angewendete lösliche Formen, deren Wirkungen als Cholesterinwirkungen angesehen wurden.

Gleichzeitig wurde bei den Versuchstieren der Blutdruck fortlaufend gemessen, da aus früheren Versuchen[3] bekannt ist, daß mit sinkendem Blutdruck die Esterasekonzentration im Blutserum abnimmt.

Zur Acetylcholindauerinfusion wurde das Acetylcholinchlorid benutzt.

Methode.

Blutdruckmessung.

Die Versuche wurden an mit 70 mg pro kg Körpergewicht Chloralose narkotisierten Katzen, die ein Gewicht zwischen 3000 und 3400 g hatten, ausgeführt. Der arterielle Blutdruck wurde in der Carotis mit der Trendelenburgschen Methode der Gegenstrominfusion gemessen und mit einem Quecksilbermanometer fortlaufend registriert. Die Zufuhr des Natriumcarbonats in die Blutbahn während der Gegenstrominfusion hatte, was die bei den Versuchen verwendeten Mengen betrifft, keinen Einfluß auf den Spaltungsablauf bei der Acetylcholinhydrolyse. Diese Feststellung wurde bei eigens zu diesem Zwecke angestellten Versuchen gemacht. Die zugeführte Menge Natriumcarbonat entsprach einem feinsteingestellten Quecksilberstrom.

Die Esterasebestimmung nach dem Prinzip der Warburg-Methode.

Der Cholinesterasegehalt des Blutserums von Katzen wurde nach dem Prinzip der Warburg-Methode, wie es von Ammon[4] angegeben worden ist, bestimmt. Die fermentative Acetylcholinhydrolyse wurde verfolgt, indem Ester und Ferment

[2] Kaufer, L.: Z. exper. Med. **62**, 571 (1928). Für die freundliche Überlassung des Cholesterinozonids bin ich den Promonta-Werken zu großem Dank verpflichtet. — [3] Zinnitz, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 316 (1939). — [4] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1933).

in einer bicarbonathaltigen Krebsringerlösung[5], die gleichzeitig mit Kohlensäure gepuffert war, zusammengebracht wurden. Wird durch die Anwesenheit von Ferment bei der Spaltung von Acetylcholin Essigsäure frei, so treibt diese eine äquivalente Menge Kohlensäure aus, die manometrisch bestimmt wird. Im Verlaufe von 3 Stunden wurde jede 30. Minute die freiwerdende Menge an Kohlensäure in cmm abgelesen und die Werte in den Abbildungen graphisch dargestellt. Bei der Durchführung der Versuche wurden Nicolai-Tröge benutzt, bei denen man Substrat- und Fermentlösungen getrennt einfüllen und jederzeit während des Versuchs im Wasserbade mischen kann. Die Versuchstemperatur des Thermostaten wurde auf 37,4° C gehalten. Als Lösungs- und Verdünnungsmittel diente zu allen Versuchen eine stets frisch bereitete Krebsringerlösung, die mit Bicarbonat und Kohlensäure so gepuffert war, daß sie einem p_H von 7,4 entsprach. Als Gasgemisch wurde das von Linde hergestellte Carbogen mit 5 Vol.% Kohlensäure benutzt.

Die einzelnen Versuche wurden so durchgeführt, daß je 2 ccm zur Hälfte mit Krebsringerlösung verdünntes Serum in das Ansatzstück des Troges pipettiert wurden. In den Trog kamen 3 ccm einer 0,5%igen Acetylcholinkrebsringerlösung. Dann wurde in der Warburg-Apparatur während des Schüttelns die Fermentverdünnung 1 : 1 des Blutserums den 15 mg Substrat zugegeben. Das Gesamtvolumen in jedem Trog betrug so während des Versuchs 5 ccm. Die Gesamtkonzentration des Acetylcholinchlorids[6] war danach 0,3% und die Gesamtserumkonzentration 20%. Für die Eigenhydrolyse des Acetylcholinchlorids wurden unter den gegebenen Bedingungen Werte von höchstens 10 cmm CO_2, die bei den vorliegenden Versuchsergebnissen stets unter der 10%igen Fehlergrenze lagen, gefunden.

Zu allen Versuchen wurde nur frisch gewonnenes Katzenblut verwendet, das aus der Carotis in ein Sedimentierglas hineinfloß. Für den Einzelversuch wurden 2 bis 2,5 ccm Blut entnommen, dessen Gerinnung mit Liquoid gehemmt wurde. Bei jeder Bestimmung wurden von dem Liquoid[6] 0,1 ccm einer 50 mg%igen Lösung gebraucht. In Kontrollversuchen ließ sich feststellen, daß dem Liquoid in der verwendeten Konzentration kein Einfluß auf den Spaltungsablauf des Acetylcholinchlorids beigemessen zu werden braucht. Das Blut wurde beim Versuch sofort nach der Entnahme zentrifugiert. Es konnte festgestellt werden, daß auch der durch mehrmalige Abzapfungen entstandene größere Blutverlust der Tiere ohne nennenswerten Einfluß auf die Endergebnisse der Versuche war.

Elektrische Vagusreizung.

Zur Vagusreizung wurden Wechselströme benutzt, die in einem Schwingungskreis mit einem Frequenzbereich von 24 bis 250 Hertz erzeugt wurden. Die Intensität der Reizung lag zwischen 0,1 und 7,0 mA. Spannung und Intensität der Reizung konnten im Reizstromkreis fortlaufend gemessen werden. Die polarisierbaren Reizelektroden waren aus nicht rostendem Stahl. Die beiden Vagi wurden am Hals des Versuchstieres schonend mit dem Messer freigelegt.

Dauerinfusion.

Zur Dauerinfusion benutzten wir eine einfache Glasapparatur, die an anderer Stelle[3] beschrieben worden ist. Zur intravenösen Einverleibung von Cholesterin wurde Cholesterinozonid verwendet.

Zur Acetylcholindauerinfusion wurde das Acetylcholinchlorid benutzt.

Außerdem kam bei den Versuchen Cholesterinacetat und Cholesterin in 1%iger Lösung in Olivenöl bei intramuskulärer, intrapleuraler und intraperitonealer Injektion zur Anwendung.

---

[5] Krebs, H. A., u. K. Henseleit: Z. physiol. Chem. **210**, 33 (1932). — [6] Der Firma Hoffmann-La Roche danke ich für die freundliche Überlasssung des Liquoids und des Acetylcholinchlorids.

Besprechung der Versuche.

Die in Abb. 1 dargestellten Kurven zeigen den Verlauf der Spaltungszeiten des Acetylcholinchlorids für den Esterasegehalt der einzelnen Blutseren in Abständen von 30 Minuten für die ersten 3 Stunden nach der Herstellung des Blutzentrifugats an. Auf der Ordinate sind die freiwerdenden CO_2-Mengen in cmm und auf der Abszisse die Spaltungszeiten des Acetylcholinchlorids in Minuten eingetragen. Bei diesem Versuch wurden zwei Dauerinfusionen mit einer 1,9%igen Cholesterinozonidlösung von 2,0 mg Cholesterin pro Minute durchgeführt. Die ausgezogenen Kurven von Abb. 1 beziehen sich auf die Esterasekonzentration im Normalserum des

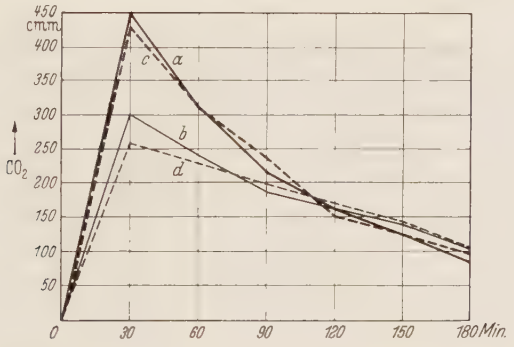


Abb. 1. Versuch vom 27. Juli 1939. Ordinate: freiwerdende Menge CO_2 in cmm; Abszisse: Spaltungszeit des Acetylcholinchlorids in Minuten.

a Gipfelpunkt bei 450 cmm freigewordene CO_2-Esterasekonzentration im Normalserum der Katze vor Beginn der Cholesterinozoniddauerinfusion.

b Gipfelpunkt bei 300 cmm freigewordene CO_2-Esterasekonzentration im Blutserum nach 15 Minuten langer Daureinfusion mit einer 1,9%igen Cholesterinozonidlösung von 2,0 mg Cholesterin pro Minute.

c Gipfelpunkt bei 430 cmm freigewordene CO_2-Esterasekonzentration im Blutserum 2 Stunden nach der Einstellung der Cholesterinozoniddauerinfusion.

d Gipfelpunkt bei 260 cmm freigewordene CO_2-Esterasekonzentration im Blutserum nach erneuter 15 Minuten langer Dauerinfusion mit einer 1,9%igen Cholesterinozonidlösung von 2,0 mg Cholesterin pro Minute.

Versuchstiers und nach 15 Minuten langer Dauerinfusion unter der Einwirkung von 30 mg Cholesterin. Die Kurven lassen erkennen, daß die Esterasekonzentration des Normalserums vor der Cholesterinozoniddauerinfusion 450 cmm CO_2 frei macht, während unter dem Einfluß der Dauerinfusion mit Cholesterinozonid die Esterase genau ein Drittel ihrer Wirksamkeit einbüßt, so daß sich nur 300 cmm CO_2 entwickeln können. Bei der weiteren Durchführung dieses Versuchs wurde nach Beendigung der Cholesterinozoniddauerinfusion zunächst eine zweistündige Ruhepause eingeschaltet. Daraufhin wurde in der gleichen Anordnung wie zu Beginn des Versuchs die Esterasekonzentration im normalen Blutserum und nach 15 Minuten langer Cholesterinozoniddauerinfusion untersucht. Konzentration und Menge des zugeführten Cholesterins waren die gleichen wie bei der schon beschriebenen ersten Dauerinfusion. Den Verlauf der Spaltungs

zeiten dieser beiden Esterasekonzentrationen vor und während der Dauerinfusion zeigen die gestrichelten Kurven von Abb. 1 an. Die freiwerdende Menge CO_2 von 430 cmm beim Normalserum beweist, daß die Wirkung der ersten Cholesterinozoniddauerinfusion zu Beginn des Versuchs innerhalb der zweistündigen Ruhepause vergangen ist, da die Esterasekonzentration mit 430 cmm CO_2 fast den gleichen Wert wie anfangs beim intakten Tier zeigt. Daraus kann geschlossen werden, daß auch beim Warmblüter, wie ich es bereits bei Versuchen an Fröschen feststellte[1], die Cholesterineinwirkung reversibel ist. Eine erneute Dauerinfusion mit Cholesterinozonid bei gleicher Konzentration und Menge des Cholesterins wie die erste hemmt nach 15 Minuten langer Dauer die Esterasewirkung des

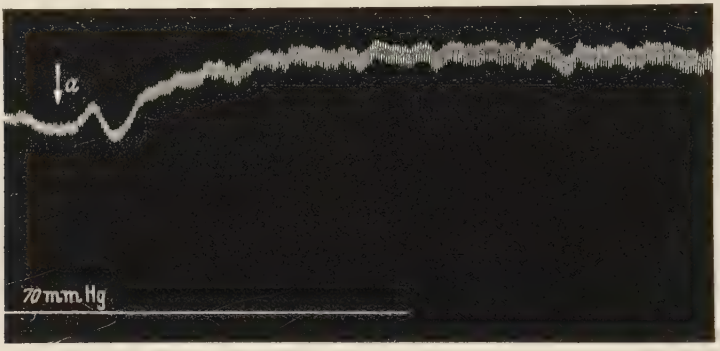


Abb. 2. Die blutdrucksteigernde Wirkung einer Dauerinfusion mit einer 1,9%igen Cholesterinozonidlösung von 2,0 mg Cholesterin pro Minute. a) Beginn der Dauerinfusion.

Blutserums in demselben Grade wie zu Versuchsbeginn. Der Wert für die freiwerdende CO_2-Menge sinkt von 460 cmm vor der Dauerinfusion auf 260 cmm während dieser herab. Der in Abb. 1 dargestellte Versuch zeigt, daß unter dem Einfluß einer Cholesterinozoniddauerinfusion die Esterasewirkung im Blutserum gehemmt wird und dadurch eine Verminderung der Esterasekonzentration mit einer Einschränkung der freiwirksamen Esterase zustande kommt. Gleichzeitig konnte erwiesen werden, daß diese Wirkung einen reversiblen Charakter hat.

Wie bereits oben erwähnt wurde, konnte ich in einer früheren Arbeit[3] eine ähnliche Verminderung der Esterasekonzentration nach spontaner Blutdrucksenkung, der Blutdrucksenkung infolge von Acetylcholindauerinfusionen und elektrischer Vagusreizung feststellen. Bei den in dieser Arbeit genannten Versuchen blieb der Blutdruck vom Beginn des Versuchs an bis zu seiner Beendigung mit geringen Schwankungen, die bei den angeführten großen Unterschieden der freiwerdenden CO_2-Mengen keine Rolle spielen, konstant auf der gleichen Höhe.

Ganz im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen, bei denen die Herabsetzung der Esterasekonzentration im Blutserum mit einer Blut-

drucksenkung einherging, kommt es trotz der Hemmung der Cholinesterase unter der Wirkung der Cholesterinozoniddauerinfusion zu einer Blutdrucksteigerung. Das kann man aus Abb. 2 ersehen, die die Blutdrucksteigerung unter Cholesterinozonid bei der ersten Dauerinfusion des Versuchs von Abb. 1 darstellt. Es handelt sich hierbei um eine absolute Blutdruckerhöhung von 27 mm Hg, bei der der Blutdruck von 146 mm Hg auf 173 mm Hg ansteigt. Bei Pfeil a beginnt die Cholesterinozoniddauerinfusion. Die Blutdruckkurve zeigt, wie unter der Dauerinfusion der Blutdruck allmählich ansteigt. Der Blutdruck bleibt dann während der Dauerinfusion gleichmäßig auf einem erhöhten Blutdruckniveau stehen und sinkt nach der Einstellung der Cholesterinzufuhr allmählich wieder auf die Ausgangshöhe zu Beginn der Infusion herab. Das war bei allenVersuchen regelmäßig der Fall. Je größer die Cholesterinmenge war, die zugeführt wurde, um so schneller entwickelte sich die Blutdrucksteigerung und um so langsamer ging der Ausgleich der Blutdruckerhöhung vor sich. Außer dieser Abhängigkeit der blutdrucksteigernden Wirkung des Cholesterins von der Konzentration und der Menge des zugeführten Stoffes bestehen noch andere Beziehungen, die die Latenz, Intensität und Dauer dieser Wirkung mitbestimmen. Aber darüber soll erst später berichtet werden.

Die Erklärung für den Blutdruckanstieg unter der Cholesterinwirkung kann nur mit Hilfe einer Gesamtbetrachtung der Rolle, die der Vagus als Antagonist des Sympathikus bei der Blutdruckbildung im lebenden Organismus spielt, geschehen. Man nimmt an, daß es entsprechend der Stärke des zentralen Vagustonus an den Wirkungsorten der peripheren cholinergischen Gefäßnervenendigungen zu unterschiedlichen Acetylcholinkonzentrationen kommen kann, die einer Erhöhung oder Senkung des Blutdrucks parallel gehen. Auf Grund eigener Versuche[3] konnte festgestellt werden, daß eine Acetylcholinkonzentrationssteigerung bei sinkendem Blutdruck mit einer Abnahme der Esterasekonzentration im Blutserum einhergeht. Dieses Verhalten ist im Sinne der Betrachtungen zu Beginn dieser Arbeit über die Wirkungsentstehung eines Potentialstoffs wie Acetylcholin verständlich. Damit ein hohes Acetylcholinpotentialgefälle für einen starken Vagustonus, der einen niedrigen Blutdruck schafft, entstehen kann, ist neben einer gesteigerten Acetylcholinproduktion auch eine erhöhte Fermenttätigkeit erforderlich. Durch die vermehrte Beanspruchung der freiwirksamen Esterase wird diese eingeschränkt und es sinkt die Esterasekonzentration im Blutserum. Wenn nun von seiten des Cholesterins die Gleichgewichtsreaktion zwischen Acetylcholin und Esterase, die den Vagustonus im Organismus reguliert, dem wiederum das adrenergische Nervensystem im antagonistischen Sinne sich angleicht, willkürlich gestört wird, dann müssen sich die Folgen mehrfach zeigen. Und zwar wird die zur Aufrechterhaltung eines bestimmten dynamischen Gleichgewichts notwendige Fermentmenge mit der Steigerung der zu-

geführten Cholesterinmenge mehr und mehr eingeschränkt. Die gebildete Acetylcholinmenge am Wirkungsort kann dabei die gleiche bleiben. Durch die Eindämmung der Fermentwirkung unter Cholesterin wird das Acetylcholinkonzentrationspotentialgefälle gesenkt und der Vagustonus vermindert. So entsteht die Niveaueinstellung für einen höheren Blutdruck mit niedrigerem Vagustonus, der von dem adrenergischen Nervensystem im antagonistischen Sinne dann gebildet wird. Dieses paradoxe Verhalten gegenüber den bisherigen Befunden, bei denen eine Blutdruckerhöhung stets mit einer Steigerung der Esterasekonzentration im Blutserum einherging, bildet den auffallendsten Befund der Cholesterinwirkung, der sich jedoch gleichfalls mit der Beschlagnahme eines Teiles der Cholinesterase erklären läßt.

Abb. 3. Versuch vom 28. Juli 1939.
a) Beginn der Dauerinfusion mit einer 1,9%igen Cholesterinozonidlösung von 3,8 mg Cholesterin pro Minute.
b) Dauerreiz des rechten und linken Vagus von 0,2 mA.
c) „ „ „ „ „ „ 0,4 mA.
d) „ „ „ „ „ „ 0,7 mA.
e) Dauerreiz des rechten und linken Vagus von 1,5 mA.
f) „ „ „ „ „ „ 2,0 mA.
g) Dauerinfusion von 19,0 γ Acetylcholinchlorid pro Minute.
h) 15 Sekunden langer Reiz beider Vagi von 0,7 mA 50 Minuten nach der Einstellung der Cholesterinozoniddauerinfusion.

Durch weitere Versuche konnte festgestellt werden, daß die freiwirksame Esterase am Wirkungsort des Acetylcholins mit Hilfe der Cholesterinozoniddauerinfusion in so starkem Maße gehemmt werden kann, daß es über das im Körper des Versuchstieres bestehende Acetylcholinkonzentrationspotentialgefälle hinaus zu keiner zusätzlichen Potentialgefällebildung mehr kommen kann. Die Wirkung einer Dauerinfusion mit einer 1,9%igen Cholesterinozonidlösung von 3,8 mg Cholesterin pro Minute führt einen solchen Zustand herbei, wie Abb. 3 zeigt. Bei Pfeil a ist der Beginn der Cholesterinozoniddauerinfusion. Wie in Abb. 2 sieht man auch hier wieder den allmählichen Blutdruckanstieg bei einer Ausgangshöhe von 108 mm Hg bis zu einem gleichmäßig hoch bleibenden Blutdruckplateau von 128 mm Hg. Vom Beginn

der Blutsteigerung an wurden beide Vagi in zunehmender Stärke von 0,2 bis zu 2,0 mA, b bis f der Kurve, ununterbrochen gereizt. Die sonst immer prompt eintretende Blutdrucksenkung durch Vagusreizung jedoch bleibt aus. Dasselbe läßt sich für eine Acetylcholinchloriddauerinfusion von 19,0 γ pro Minute (Pfeil g der Kurve) feststellen, die völlig wirkungslos bleibt. Hierbei muß noch erwähnt werden, daß bei dem Versuchstier bereits zwei Cholesterinozoniddauerinfusionen mit kleinen Dosen ausgeführt wurden, bis die in Abb. 3 dargestellte Dauerinfusion vorgenommen wurde. Durch wirksame Vagusreize, die mit einem Testreiz zu Beginn des Versuchs verglichen wurden, konnte aber nachgewiesen werden, daß die Wirkungen der beiden ersten Cholesterinozoniddauerinfusionen zum größten Teile zurückgegangen waren. Bemerkenswert ist, daß bei der vollkommenen Wirkungslosigkeit der elektrischen Vagusreizung und der Acetylcholindauerinfusion die blutdruckerhöhende Wirkung des Cholesterins unberührt weiterbesteht. Die blutdrucksenkende Wirkung unter h in Abb. 3 zeigt, daß 50 Minuten nach der Einstellung der Cholesterinozoniddauerinfusion die Cholesterinwirkung bereits im Begriff ist zu vergehen, da ein 15 Sekunden langer Reiz beider Vagi mit 0,7 mA bereits wieder wirksam wird.

Bei der Suche nach einer Erklärung dieses Phänomens kann man nur die unter der Cholesterinwirkung vollständig aufgehobene Esterasewirkung verantwortlich machen, die für ein zusätzlich zu dem bestehenden Vagustonus gebildetes Acetylcholinpotentialgefälle keine freiwirksame Esterase am Wirkungsort mehr übrig läßt. Selbst die beim Abbau des körpereigenen Acetylcholinpotentialgefälles zu erneuter Wirksamkeit freiwerdende Esterase wird am Wirkungsort der parasympathischen Nervenfasern zum Aufbau des körpereigenen Acetylcholinpotentialgefälles sofort wieder benötigt und gebunden. Diese Stabilisierung der freiwirksamen Esterase im Organismus scheint der augenfälligste Befund der Cholesterinwirkung zu sein. Leitet man dieses Verhalten des Cholesterins in bezug auf die Funktion der Esterase bei der Bildung des Blutdrucks ab, so muß jede Cholesterinzufuhr durch die Inhaftierung der Cholinesterase zu einer Erstarrung des dynamischen Gleichgewichts, das Acetylcholin und Esterase einerseits und Adrenalin andererseits in ständigem Wechsel bilden, führen, da der parasympathische Reaktionspartner in seiner Funktion gelähmt wurde.

Aber auch bei diesem Versuch kommt es im Blutserum nur zu einer Einschränkung der Esterasewirkung um ein Drittel. Das zeigt Abb. 4. Auf der Ordinate ist die freiwerdende Menge CO_2 in cmm und auf der Abszisse die Spaltungszeit des Acetylcholinchlorids in Minuten eingetragen. Die ausgezogenen Kurven stellen den Wirkungsgrad der Esterase im Normalserum vor Beginn der Cholesterinozoniddauerinfusion und nach 15 Minuten langer Dauerinfusion mit der 1,9%igen Cholesterinozonidlösung von 3,8 mg Cholesterin pro Minute, was insgesamt 57 mg beträgt, dar. Bei den

gestrichelten Kurven wurden jeweils die halben Konzentrationen der Serumesterase, die bei den ausgezogenen Kurven benutzt worden waren, verwendet. Das Blutserum wurde 1 : 3 mit Krebsringerlösung verdünnt. Diese Versuche wurden angestellt, um ein Maß für den Grad der Esterasehemmung durch Cholesterin zu bekommen. Aus den Kurven ist ersichtlich, daß die Esterase des Normalserums vor der Cholesterinozoniddauerinfusion 430 cmm CO_2 in Freiheit setzt, während die Esterase des Blutserums nach 15 Minuten langer Dauerinfusion nur 265 cmm CO_2 entwickelt. Die Esterase hat also um ein Drittel ihrer Wirksamkeit eingebüßt. Weiterhin zeigt die gestrichelte Kurve der halben Esterasekonzentration im Normalserum vor der Cholesterinozoniddauerinfusion 275 cmm freiwerdende Kohlensäure an. Hieraus kann man erkennen, daß der

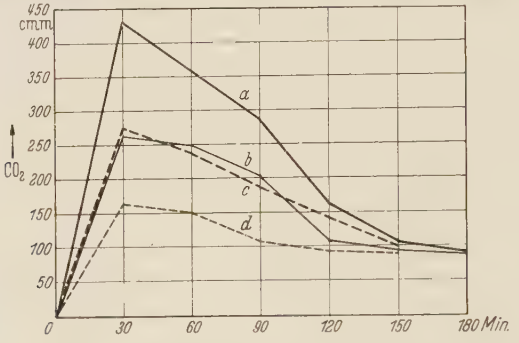


Abb. 4. Versuch vom 28. Juli 1939. Ordinate: freiwerdende Menge CO_2 in cmm; Abszisse: Spaltungszeit des Acetylcholinchlorids in Minuten.

a Gipfelpunkt bei 430 cmm freigewordene CO_2-Esterasekonzentration im Normalserum der Katze vor Beginn der Cholesterinozoniddauerinfusion.

b Gipfelpunkt bei 265 cmm freigewordene CO_2-Esterasekonzentration im Blutserum nach 15 Minuten langer Dauerinfusion mit einer 1,9%igen Cholesterinozonidlösung von 3,8 mg Cholesterin pro Minute.

c Gipfelpunkt bei 275 cmm freigewordene CO_2 1 : 3 mit Krebsringerlösung verdünnte Esterase im Blutserum vor Beginn der Cholesterinozoniddauerinfusion (ausgezogene Kurve mit dem Gipfelpunkt bei 430 cmm freigewordene CO_2).

d Gipfelpunkt bei 165 cmm freigewordene CO_2 1 : 3 mit Krebsringerlösung verdünnte Esterase im Blutserum während der Cholesterinozoniddauerinfusion (ausgezogene Kurve mit dem Gipfelpunkt bei 275 cmm freigewordene CO_2).

Grad der Hemmung, der die Esterase im Blutserum um ein Drittel ihrer Wirkung einschränkt, einer Abnahme der Esterasekonzentration im Blutserum um die Hälfte entspricht.

Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, daß die Einschränkung der Fermentwirkung um ein Drittel ihrer Wirksamkeit als oberste Schranke anzusehen ist. Wenn dieser Grad der Hemmung erreicht worden ist, dann steht keine freiwirksame Esterase zur Acetylcholinpotentialgefällebildung am Wirkungsort der cholinergischen Gefäßnervenendigungen mehr zur Verfügung, sei es für das durch Dauerzufuhr auf dem Wege der Blutbahn herbeigeschaffte Acetylcholin oder für das durch elektrische Vagusreizung

eigenproduzierte Acetylcholin. Da aber im Blutserum auch noch weiterhin Esterase nachweisbar ist, so scheint unter Cholesterinwirkung eine Blockade der Esterase am Wirkungsort des Acetylcholins zustande zu kommen, die jegliche freiwirksame Esterase absperrt. Schließlich ist es interessant festzustellen, daß sowohl bei der Zufuhr großer Cholesterinozonidmengen als auch bei starker elektrischer Vagusreizung[3] die Cholinesterase jedesmal nur ein Drittel ihrer Wirksamkeit einbüßen kann.

Es mag gewagt erscheinen, wenn in dieser Arbeit die Cholesterinozonidwirkung der Cholesterinwirkung gleichgesetzt wird. Dazu muß jedoch gesagt werden, daß in Parallelversuchen mit einer 1%igen Cholesterinacetat- und Cholesterinolivenöllösung, die intramuskulär, intrapleural und intraperitoneal gegeben wurde, die gleichen Wirkungen wie bei der Cholesterinozoniddauerinfusion nachgewiesen werden konnten. Nur waren die Wirkungen der Öllösungen nie so intensiv, obwohl größere Mengen gegeben wurden, was in der Art der Darreichung begründet ist. Um eine starke Cholesterinwirkung zu erhalten, ist eine schnelle Zufuhr hoher Dosen erforderlich, die in der Lage ist, den Cholesterinspiegel in den Geweben des Organismus zu erhöhen. Bei der Darreichung der 1%igen Cholesterinolivenöllösung konnten die leichteren Grade der Esterasehemmung unter Cholesterin beobachtet werden. Sie zeigten sich an der Einschränkung und teilweisen Aufhebung der Acetylcholineinzel- und Dauerwirkung sowie einer schwächeren blutdrucksenkenden Wirkung des elektrischen Vagusreizes. Mit Hilfe der Cholesterinöllösungen konnte die Veränderung der Esterasewirkung und Verminderung der Esterasekonzentration im Blutserum als Cholesterinwirkung identifiziert werden, da bei alleiniger Olivenölgabe diese Änderungen unterblieben. Hieraus konnte weiterhin gefolgert werden, daß auch die Rolle, die das Schutzkolloid bei der Cholesterinozonidwirkung spielt, nicht so maßgeblich ist, daß die Hemmung der Esterase allein auf seine Kosten geht.

Schlußbetrachtung.

Die Veränderungen in der Dynamik des Potentialwirkungsmechanismus des Acetylcholins bei der Schaffung der einzelnen Potentialbedingungen, die den Verlauf der Acetylcholinwirkung regulieren, läßt in der Beeinflussung der am Wirkungsort des Acetylcholins zur Verfügung stehenden freiwirksamen Esterase den Angriffspunkt der Cholesterinwirkung erkennen. Die Versuche in dieser Arbeit zeigen, daß durch die Zufuhr von Cholesterin eine Verminderung der Esterasekonzentration im Blutserum von Katzen zustande kommt. Den gleichen Befund konnte ich schon früher[3] als Folge elektrischer Vagusreizung, bei Acetylcholindauerblutdrucksenkungen und spontanen Blutdrucksenkungen erheben. Damals wurde die Esterasehemmung als eine Folge von Veränderungen an den Zelloberflächen, die den Austausch der Zellbestandteile mit den Stoffen des

umgebenden Gewebes fördert oder hemmt, gedeutet. Mit zunehmender Intensität cerebraler Impulse, stärker werdender elektrischer Vagusreizung und Steigerung des Acetylcholinkonzentrationspotentialgefälles durch Zufuhr auf dem Wege über die Blutbahn kommt es am Wirkungsort cholinergischer Nervenfasern mehr und mehr zu einer festen Verankerung der zur Verfügung stehenden freiwirksamen Esterase. Der tiefere Sinn dieses Vorgangs liegt, wie ich schon in einer früheren Arbeit[3] ausführte, in einer Ökonomisierung der Zustandsänderungen bei der physiologischen Vagusreizbildung im Organismus. Der gleiche Vorgang der Eindämmung der Esterasewirkung konnte mit Hilfe von Cholesterin imitiert werden.

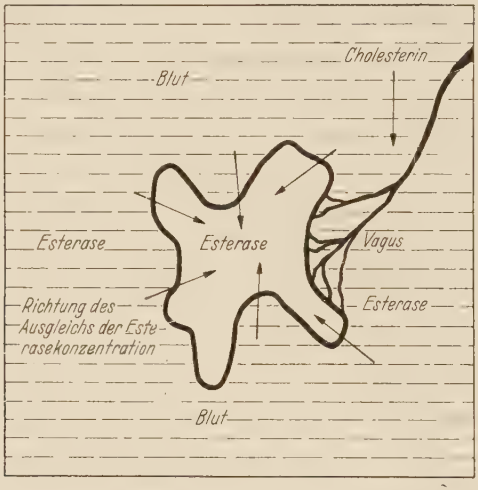


Abb. 5. Schematische Darstellung der Cholesterinwirkung.

Ob der tierische Organismus sich bei der Bildung des physiologischen Vagusreizes des Cholesterins bedient, kann auf Grund der vorliegenden Versuche nicht entschieden werden.

Abschließend soll mit Hilfe einer schematischen Darstellung (Abb. 5) versucht werden, die Vorgänge beim Zustandekommen der Cholesterinwirkung aufzuklären. Ich will dies aus den Veränderungen beim Ablauf der einzelnen Potentialbedingungen des Acetylcholinwirkungsmechanismus, die bei den beschriebenen Versuchen beobachtet werden konnten, zu deuten versuchen. Die in der Zeichnung dargestellte Zelle eines Erfolgsorgans des Vagus, die unter dem Einfluß cerebraler Impulse ständig ein bestimmtes Acetylcholinkonzentrationspotentialgefälle unterhält, wird aus dem Bestreben der Stoffe des Zellinnern heraus sich mit ihrer eigenen Konzentration jener der Blutflüssigkeit, die sie umspült, anzugleichen, ein Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen des Acetylcholins im Zellinnern und dem im umspülenden Blut herzustellen versuchen. Es ist

anzunehmen, daß der vom zentralen Vagustonus der Zelle über den Vagusnerv mitgeteilte Dauerreiz auf Grund von Permeabilitätsveränderungen an den Zelloberflächen den Ausgleich der Acetylcholinkonzentrationen zwischen dem umspülenden Blut und dem Zellinnern reguliert. Dieser wird in Abhängigkeit vom Permeabilitätsgrade der Zelloberfläche langsamer oder schneller vor sich gehen. In demselben Sinne wird auch die Esterasekonzentration im Zellinnern sich der des umspülenden Blutes angleichen. Durch die Erhöhung des Cholesterinspiegels im Blute wird, wie die Versuche in dieser Arbeit zeigen, die Esterasekonzentration im Blute herabgesetzt. Hierdurch kommt es auch im Zellinnern bei Erfolgsorganen cholinergischer Nervenfasern zu einer Verminderung der Esterasekonzentration und damit Senkung des wirksamen Acetylcholinpotentialgefälles. Indem somit durch Cholesterin die Konzentration der Außenesterase im Blute herabgesetzt wird, nimmt die Esterasekonzentration im Zellinnern gleichfalls ab. Durch die Inaktivierung der Außenesterase im Blute mit Hilfe von Cholesterin, die sich in der Richtung zum Zellinnern fortpflanzt, wird somit das Acetylcholinpotentialgefälle im Sinne von Straubs Potentialtheorie gesteuert, die besagt, daß „durch den Ausgleich eines bestimmtwertigen Konzentrationspotentials in der Richtung zum Zellinnern“[7] eine Potentialwirkung zustande kommt.

Zusammenfassung.

1. Durch die Wirkung von Cholesterindauerinfusionen kommt es zu einer Verminderung der Esterasekonzentration im Blutserum von Katzen.

2. Die durch elektrische Vagusreizung entstehende Blutdrucksenkung und die Acetylcholineinzel- und Dauerblutdrucksenkung werden durch Cholesterindauerinfusion aufgehoben.

3. Die gleiche Wirkung wie die Cholesterindauerinfusion hat eine intramuskuläre, intrapleurale und intraperitoneale Injektion von Cholesterin.

4. Die esterasehemmende Wirkung des Cholesterins nimmt mit der Darreichung größerer Dosen und Steigerung der Zufuhrgeschwindigkeit zu.

5. Die Cholesterinwirkung ist reversibel.

6. Die Veränderung in der Dynamik des Potentialwirkungsmechanismus des Acetylcholins im Sinne von Straubs Potentialtheorie durch Cholesterin wird besprochen.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

[7] Straub, W.: Sitzungsber. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg 1907; Naunyn-Schmiedebergs Arch. **57**, 423 (1907).

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in Bonn.
(Direktor: Prof. Dr. F. Tiemann.)

Über kristallinisches Insulin.

XII. Mitteilung:

Das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft (IZK) des Blutes beim Diabetes mellitus*.

Von

Hans Kohl.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 18. Dezember 1939.)

Im Rahmen von gemeinsam mit M. Bürger durchgeführten Arbeiten über kristallinisches Insulin (1) konnte im Jahre 1933 der Nachweis erbracht werden, daß gleiche Mengen Insulin ihre blutzuckersenkende Eigenschaft verlieren, wenn sie längere Zeit mit überlebendem Blut in Berührung gestanden haben [M. Bürger und H. Kohl (2)]; es hatte sich gezeigt, daß

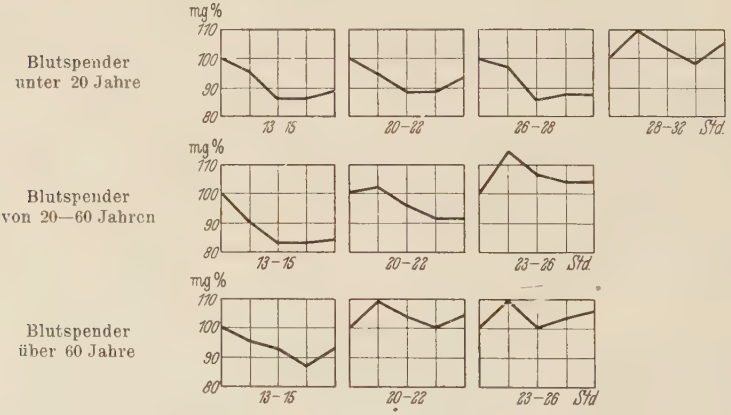


Abb. 1. Mittlere Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches bis zur Insulinzerstörung beim Gesunden in verschiedenen Jahresklassen. (Mittelwerte errechnet aus je 10 Einzelversuchsreihen, Ausgangswert = 100).

die insulinzerstörende Kraft (IZK) des Gesamtblutes eine intensivere ist als die des blutkörperchenfreien Serums. Die Beobachtungen bei Leukämiekranken sprechen dafür, daß die insulinzerstörende Kraft vorwiegend den weißen Blutkörperchen anhaftet, denn bei Verwendung von Leukämiker-

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, der an dieser Stelle bestens gedankt sei.

blut (Leukocyten: über 120000) trat der Insulinzerstörungseffekt bereits schon nach 2–3 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches in Erscheinung, während unter denselben Versuchsbedingungen das Blut eines gesunden Probanden (Leukocyten: 6—8000) dieselbe Menge kristallinischen Insulins in vitro nach einer Kontaktdauer von etwa 20—22 Stunden zerstört.

Weitere Untersuchungen [H. Kohl, H. Selbach und A. Janning (3)(4)] haben gezeigt, daß die Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches bis zur Insulininaktivierung beim gesunden Probanden vom Lebensalter abhängig ist. Wie aus der Abb. 1 ersichtlich, liegt der Insulinzerstörungseffekt des gesunden Blutes im Mittel von je 10 Einzelversuchsreihen im Alter bis zu 20 Jahren bei etwa 28 Stunden, im Alter von 20–60 Jahren etwa bei 22 Stunden, beim alternden Menschen über 60 Jahre etwa bei 18 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches.

In Fortsetzung eigener früherer Untersuchungen, die gezeigt hatten, daß das diabetische Blut unter Beibehaltung derselben Versuchsbedingungen, die gleiche Insulinmenge wesentlich schneller, bereits nach etwa 9 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches zerstört, konnte W. Tochtermann in unseren Laboratorien diese Befunde bestätigen (5).

Im Hinblick auf die Bedeutung dieser Befunde für das Krankheitsbild des Diabetes mellitus, auf die M. Bürger bereits auf dem Kongreß für innere Medizin in Wiesbaden 1937 (6) hingewiesen hat, erschien es mir erforderlich, diese Untersuchungsergebnisse durch weitere Versuchsreihen zu ergänzen, besonders auch darum, weil es mir inzwischen gelungen war, den früheren Untersuchungsgang durch die Herstellung einer einfachen Apparatur zu verbessern. Durch die Anwendung dieses Apparates, den ich unter der Bennennung „IZK-Meter" in der Klinischen Wochenschrift (7) beschrieben habe, sind die Hauptforderungen bei der Insulininaktivierung durch überlebendes Blut: konstante Temperatur von 37°, Sterilität und vollständige Defibrinierung sicherer gewährleistet als nach dem früheren Untersuchungsgang, der in früheren, in diesem Archiv erschienenen Arbeiten (2) (3) wiederholt beschrieben wurde.

Im folgenden wird in kurzem die verbesserte Methodik geschildert.

Verbesserung der Methodik durch Anwendung des „IZK-Meters".

Es handelt sich um ein Glasgefäß mit doppelten Glaswänden, nach dem Prinzip einer Thermosflasche angefertigt, welches bis zu 40 ccm Blut fassen kann. Dieses becherförmige Glasgefäß wird vor Versuchsbeginn wie auch das übrige System durch Auskochen sterilisiert. Nachdem das auf seine insulinzerstörende Kraft zu untersuchende Blut am besten mit einem an einer mittelstarken Aderlaßkanüle befestigten Gummischlauch direkt von der Kubitalvene des Spenders in das Glasgefäß gebracht ist, wird dieses mit einem breiten Gummipfropf, der durchbohrt ist und in der

Durchbohrung einen Glasquirl trägt, verschlossen; durch einfaches Drehen des Glasquirls ist nach 3—4 Minuten das Defibrinieren des Blutes abgeschlossen. Der Gummipfropf mit dem Glasquirl und dem daranhaftenden Fibringerinnsel wird dann entfernt und ein zweiter Gummipfropf aufgesetzt; dieser Gummipfropf trägt in zwei Durchbohrungen je ein Glasröhrchen, von denen das eine kurz ist, das andere längere Glasröhrchen reicht bis zum Boden des Glasgefäßes; an dem kürzeren Röhrchen befindet sich ein Gummigebläse zur Herstellung eines Überdruckes im Glasgefäß; das zweite Röhrchen trägt an einem dünnen Gummischlauch eine Doppelkanüle. Oberhalb der Doppelkanüle befindet sich eine Klemme, durch die das System bei Herstellung des Überdruckes abzuschließen ist. In einem Metallrahmen befinden sich 4 6 (Zahl kann beliebig variiert werden) spitz zulaufende Glasampullen, welche graduiert sind für 0,5 ccm Insulinlösung (40 γ kristallinischen Insulins* in 0,5 ccm Phosphatpufferlösung p_H — 7,34) und für 4 ccm defibriniertes Blut. Diese Glasampullen sind mit einer Gummikappe, wie sie die im Handel befindlichen Insulinampullen tragen, luftdicht verschlossen; der Metallrahmen mit den Glasampullen wird in ein Wasserbad von 37° eingesetzt.

So ist es sehr einfach, bei Überdruck im Glasgefäß nach Einstechen der Doppelkanüle durch die Gummikappe der zu füllenden Glasampullen die gewünschte Menge Blut (4 ccm) durch Öffnen der Klemme in die Glasampulle einfließen zu lassen; die Insulinlösung in der genannten Konzentration wird vorher mittels einer kleinen Spritze bis zu der Markierung 0,5 ccm in die Glasampullen gebracht. Nachdem die erforderliche Menge von 4 ccm defibriniertem Blut in die Glasampullen gebracht ist, wird der Metallrahmen mit dem Blut-Insulingemisch aus dem Wasserbad herausgenommen und bis zur intraperitonealen Injektion beim Kaninchen im Brutschrank bei 37° aufbewahrt.

In umfangreichen Untersuchungen, über die an anderer Stelle noch ausführlich berichtet wird, wurde mit Hilfe dieses Apparates das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes bei den verschiedensten Krankheitszuständen, insbesondere bei gerade in erbbiologischer Hinsicht wichtigen Reihenuntersuchungen an gesunden und diabetischen Nachkommen diabetischer Eltern geprüft.

Es hat sich gezeigt, daß die Inaktivierungszeiten nach der verbesserten Methodik wesentlich exakter festgelegt werden können als nach dem früheren Untersuchungsgang.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Ehe die Versuchsergebnisse beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus im einzelnen besprochen werden, soll an Hand der Tabelle 1 das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes (IZK) bei einem gesunden menschlichen Probanden veranschaulicht werden.

* Das kristallinische Insulin wurde mir in liebenswürdiger Weise von der I. G. Farben zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. Normale insulinzerstörende Kraft des Blutes beim Gesunden. Blutspender: männl. Alter: 41 Jahre, Leukocyten: 7600.

1. Kaninchen Nr.	108	109	110
2. Kaninchengewicht in g	2050	1950	2000
3. Kontaktdauer: Insulin + Blut in Std.	19	21	23
4. Kaninchenblutzucker in mg %:			
5. vor der intraperitonealen Injektion	96	85	94
6. nach $^1/_2$ Std.	85	92	92
7. „ 1 „	44	105	101
8. „ $1^1/_2$ „	51	80	99
9. „ 2 „	24	82	105
10. Insulinzerstörungseffekt	0	+	+
11. IZK-Normalwert (Mittel von 30 gesunden Probanden zwischen 20 und 60 Jahren)	bei 22,1 Stunden Kontaktdauer, Streuung: $\frac{+3,9}{-6,1}$		

Es handelt sich bei dem in der Tabelle 1 wiedergegebenen Einzelversuch um einen 41jährigen Mann; der Insulinzerstörungseffekt tritt, wie aus der Rubrik 10 ersichtlich, nach 21 Stunden Kontaktdauer (Rubrik 3) des Blut-Insulingemisches in Erscheinung; der im Mittel von 30 Einzelversuchsreihen an gesunden Probanden im Alter von 20–60 Jahren errechnete Normalwert liegt bei der 22.1. Kontaktstunde des Blut-Insulingemisches mit einer Streuung von $\frac{+3,9}{-6.1}$ (Rubrik 11).

Demgegenüber steht in der Tabelle 2 ein Einzelversuch bei einer weiblichen Zuckerkranken:

Tabelle 2. Steigerung der insulinzerstörenden Kraft des Blutes beim Diabetes mellitus.

Blutzucker: 280 mg%, Harnzucker: 4,4% = 66 g, Aceton: negativ. Acetessigsäure: negativ. Blutspender: weibl. Alter: 60 Jahre, Leukocyten: 8200.

1. Kaninchen Nr.	45	46	47
2. Kaninchengewicht in g	2200	1950	2200
3. Kontaktdauer: Insulin + Blut in Std.	7	8	10
4. Kaninchenblutzucker in mg %:			
5. vor der intraperitonealen Injektion	113	96	91
6. nach $^1/_2$ Std.	65	109	96
7. „ 1 „	67	92	89
8. „ $1^1/_2$ „	85	92	89
9. „ 2 „	82	96	87
10. Insulinzerstörungseffekt	0	+	+

Hier liegt der Insulinzerstörungseffekt bei einer Kontaktdauer von 8 Stunden, ersichtlich aus Rubrik 3 und 10.

Es folgt nun eine tabellarische Zusammenstellung der Untersuchungen von W. Tochtermann an 20 Kranken mit Diabetes mellitus.

Diese in der Tabelle 3 wiedergegebenen Untersuchungen wurden nach der früheren Methodik durchgeführt. Es zeigt sich, daß in dem Versuch Nr. 1 der Insulinzerstörungseffekt bereits nach einer Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches von 6 Stunden auftritt, bei 8 Versuchsreihen (Versuch Nr. 2—9) tritt der Insulinzerstörungseffekt nach einer Kontaktdauer von 8 Stunden in Erscheinung, bei 6 Versuchsreihen (Versuch Nr. 10—15) nach 10 Stunden, bei 4 Versuchsreihen (Versuch Nr. 16—19) nach 12 Stunden und bei einem Versuch (Nr. 10) sogar erst nach 14 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches.

Nach diesen mit Hilfe der früheren Methodik durchgeführten Untersuchungen ist demnach für das Auftreten des Insulinzerstörungseffektes im Blut von 20 Zuckerkranken eine Streuung von 6—14 Kontaktstunden, also eine Streuungsbreite von 8 Stunden festzustellen.

Diese unterschiedlichen Befunde in den Insulininaktivierungszeiten lassen sich nicht ohne weiteres erklären; jedenfalls ist für die Intensität der insulinzerstörenden Kraft des zuckerkranken Blutes nicht die Schwere des Diabetes verantwortlich zu machen; der Versuch Nr. 1 in Tabelle 3 zeigt z. B. ein auffallend schnelles Auftreten des Insulinzerstörungseffektes nach einer Kontaktdauer von 6 Stunden; es handelt sich hier aber nicht

Tabelle 3. Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes beim Diabetes mellitus.

(Geprüft von W. Tochtermann nach der früheren Methodik.)

Nr.	Geschlecht	Alter Jahre	Blutzucker mg %	Harnzucker %	Harnzucker g	Aceton	Insulineinheit	Leukocyten	Insulin-Zerstörungseffekt	Blut-Insulin Kontaktdauer in Std.
1	weiblich	57	249	1,5	22,5	0	—	7800	+	6
2	männlich	54	298	1,5	60	+	40	5600	+	8
3	weiblich	57	221	0,5	4	0	—	8200	+	8
4	männlich	52	304	4	100	0	—	5600	+	8
5	weiblich	56	259	0	0	0	—	7300	+	8
6	männlich	68	179	0,18	2,7	0	—	4600	+	8
7	männlich	58	263	2,4	36	0	—	5600	+	8
8	weiblich	58	224	0,8	8,8	0	60	13400	+	8
9	männlich	66	163	0,6	9	0	—	6600	+	8
10	männlich	58	197	0,3	4,2	0	—	5900	+	10
11	männlich	18	257	0,8	28,8	0	100	10400	+	10
12	männlich	30	146	0,2	4	0	20	6700	+	10
13	weiblich	30	323	1,1	15,4	0	25	5800	+	10
14	weiblich	46	150	1,6	18,4	0	30	10200	+	10
15	weiblich	60	251	1,6	32	0	—	5400	+	10
16	weiblich	58	178	0	0	0	—	7300	+	12
17	männlich	36	173	0	0	0	10	8600	+	12
18	männlich	62	157	0,3	0	0	—	6200	+	12
19	weiblich	60	206	0	0	0	—	7200	+	12
20	weiblich	55	217	0,4	4	0	30	9800	+	14
								Mittelwert:		$9{,}5 \begin{smallmatrix} +4{,}5 \\ -3{,}5 \end{smallmatrix}$

um einen schweren, sondern um einen leichten Diabetes; andererseits tritt der Insulinzerstörungseffekt bei einem Kranken mit einem schweren Diabetes (Versuch Nr. 11) erst nach 10 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches auf.

Wenn wir die einzelnen Versuche in der Tabelle 3 hinsichtlich der Höhe des Blutzuckers in Beziehung zu dem Zeitpunkt des Auftretens des Insulinzerstörungseffektes untereinander vergleichen, so läßt sich auch eine Abhängigkeit der Intensität der IZK von der Höhe des Blutzuckers nicht feststellen.

Auch ist das beschleunigte Auftreten des Insulinzerstörungseffektes beim Diabetes mellitus in keiner Weise von dem Lebensalter des Probanden abhängig, wie wir es vom gesunden Menschen wissen (3).

Es ist weiter wichtig, darauf hinzuweisen, daß die in der Tabelle 3 wiedergegebenen Inaktivierungszeiten mit einer Streuung von 6–14 Stunden keinesfalls eine genaue Zeitangabe für das Auftreten des Insulinzerstörungseffektes darstellen können, denn die intraperitonealen Injektionen des Blut-Insulingemisches am Kaninchen sind fast durchweg in jedem Einzelversuch in zweistündlichen Abständen vorgenommen, so daß z. B. bei Versuch Nr. 20 der Insulinzerstörungseffekt nicht nach 14 Stunden, sondern schon nach 13 Kontaktstunden und bei Versuch Nr. 1 nicht nach 6 Stunden, sondern schon nach 5 Kontaktstunden in Erscheinung treten könnte, wenn die Versuchsreihen am Kaninchen in einstündlichen Abständen durchgeführt worden wären.

Bei der Beurteilung der in Tabelle 3 wiedergegebenen Untersuchungsergebnisse ist ferner zu berücksichtigen, daß man bei dem früheren Untersuchungsgang methodische Fehlerquellen in Erwägung ziehen könnte. Hier wäre daran zu denken, daß einmal eine Änderung der Temperatur durch Abkühlung während des Versuchsganges eintreten und so auf die wahrscheinlich fermentativen Vorgänge bei der Insulininaktivierung sich im Sinne einer Verzögerung auswirken könnte. Da, wie die Versuche bei Leukämiekranken (2) gezeigt haben, sicherlich irgendwelche noch ungeklärte Beziehungen zwischen Leukocytenzahl und der IZK des Blutes bestehen, wäre ferner vorstellbar, daß bei einer unvollständigen Defibrinierung die cellulären Elemente des Blutes insbesondere die Leukocyten zu einem großen Teil noch in dem Fibringerinnsel haften und mit diesem entfernt werden, wodurch sie dann dem zu untersuchenden Blut mehr oder weniger fehlen und dadurch den Insulinzerstörungseffekt verzögern können.

Diese Mängel sind durch die Anwendung des IZK-Meters weitgehend auszuschalten, insbesondere, weil der im Kapitel Methodik beschriebene Glasquirl am Ende eine mehrfach durchlöcherte, olivenförmige Erweiterung trägt, in welcher das Fibringerinnsel nach der Defibrinierung ohne wesentliche Beimengung von cellulären Blutelementen haften bleibt.

Weiterhin ist die Sterilität des zu untersuchenden Blutes durch die Anordnung der Apparatur sicherer gewährleistet als früher.

Mit Hilfe dieser verbesserten Methodik habe ich bei weiteren 10 Kranken mit Diabetes die insulinzerstörende Kraft des Blutes untersucht; die Untersuchungsergebnisse sind umfangreichen Reihenuntersuchungen an diabetischen und nichtdiabetischen Nachkommen diabetischer Eltern entnommen[1].

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse von 10 Einzelversuchsreihen an Zuckerkranken zusammengestellt; diese Untersuchungen wurden mit Hilfe der verbesserten Methodik durchgeführt.

Ein Vergleich der in Tabelle 4 wiedergegebenen Inaktivierungszeiten mit den in Tabelle 3 zusammengestellten Werten zeigt im ganzen gesehen eine Übereinstimmung der Ergebnisse. Von 10 Versuchsreihen an diabetischen Patienten liegt die Blut-Insulinkontaktdauer bis zur Insulinzerstörung im Mittel bei 8,9 Stunden $\left(\text{Streuung} - \begin{smallmatrix}+1{,}1\\-0{,}9\end{smallmatrix}\right)$, von 20 Versuchsreihen in Tabelle 3 im Mittel bei 9,5 Kontaktstunden $\left(\text{Streuung} - \begin{smallmatrix}+4{,}5\\-3{,}5\end{smallmatrix}\right)$.

Tabelle 4. Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes beim Diabetes mellitus.

(Geprüft nach der durch den IZK-Meter verbesserten Methodik.)

Nr.	Geschlecht	Alter Jahre	Blutzucker mg %	Harnzucker %	Harnzucker g	Aceton	Insulineinheit	Leukocytenzahl	Insulin-Zerstörungseffekt	Blut-Insulin Kontaktdauer in Std.
1	weiblich	60	280	4,4	66	0	—	normal	+	8
2	weiblich	32	350	1,8	27	(+)	45	normal	+	8
3	weiblich	57	240	2,8	56	0	40	normal	+	8
4	weiblich	35	280	7,2	108	0	25	normal	+	8
5	weiblich	58	170	1,4	28	0	—	normal	+	8
6	weiblich	60	215	2,4	24	0	0	normal	+	9
7	männlich	32	302	4,5	57	(+)	50	normal	+	10
8	weiblich	77	260	2,8	42	0	0	normal	+	10
9	männlich	36	280	7	105	(+)	0	normal	+	10
10	weiblich	56	217	6,2	93	0	0	normal	+	10
									Mittelwert	$8{,}9 \begin{smallmatrix}+1{,}1\\-0{,}9\end{smallmatrix}$

In Tabelle 4 stehen von 10 Versuchsreihen 5 Versuche (Versuch Nr. 1—5) mit 8 Versuchen von 20 Versuchsreihen der Tabelle 3 (Versuch Nr. 2—9) mit einer Inaktivierungszeit von 8 Stunden im Einklang, ebenfalls 4 Versuche der Tabelle 4 (Versuch Nr. 7—10) mit 6 Versuchen der Tabelle 3 (Versuch Nr. 10—15), und zwar mit einer Inaktivierungsdauer von 10 Kontaktstunden; ferner ist der Versuch Nr. 6 in Tabelle 4 mit einer Inaktivierungsdauer von 9 Stunden ohne weiteres in die Inaktivierungszeiten von 8—10 Kontaktstunden der Tabelle 3 einzugruppieren. Die übrigen 6 Versuche der Tabelle 3 fallen mit einer Inaktivierungszeit von 12 Stunden

[1] Da diese Reihenuntersuchungen gerade in erbbiologischer Hinsicht von großer Wichtigkeit erscheinen, soll später im einzelnen darüber berichtet werden.

in 4 Fällen (Versuch Nr. 16—19) und von 6 und 14 Stunden (Versuch Nr. 1 und 20) außerhalb der Reihe. Es ist also eine Streuung von 6—14 Stunden bei den 20 Versuchsreihen der Tabelle 3 vorhanden. Die Streuung in Tabelle 4 liegt bei 10 Versuchsreihen zwischen 8 und 10 Stunden; hier ist aber zu berücksichtigen, daß die Streuung bei einer größeren Anzahl von z. B. 20 Versuchsreihen sich ebenfalls vergrößern kann.

Trotzdem ist in beiden Tabellen die Konstanz der Inaktivierungszeiten von 8—10 Kontaktstunden besonders bei den mit Hilfe der verbesserten Methodik durchgeführten Versuchsreihen der Tabelle 4 sehr auffällig. Hier liegt die Annahme nahe, daß zu dieser Konstanz die Beseitigung der beschriebenen Fehlerquellen durch die Verbesserung der Methodik wesentlich beigetragen hat. Andererseits wäre aber bei dieser für einen biologischen Untersuchungsgang doch sehr ungewöhnlichen Konstanz der Inaktivierungszeiten von 8—10 Stunden, die unabhängig von der Schwere des Diabetes und von der Höhe des Blutzuckers zu sein scheint, daran zu denken, daß die von uns als insulinzerstörende Kraft bezeichnete Eigenschaft des Blutes vielleicht beim gesunden Menschen durch einen zweiten unbekannten Faktor im Blut auf einer minimalen Intensität erhalten wird; dem zuckerkranken Blut des Diabetikers könnte aber dieser „insulinerhaltende" Faktor vollständig fehlen und so die Steigerung der insulinzerstörenden Kraft des diabetischen Blutes verursachen.

Jedenfalls kann als sicher angenommen werden, daß das Blut des Zuckerkranken im Gegensatz zu dem Blut des gesunden Menschen unter gleichen Bedingungen eine bestimmte Insulinmenge wesentlich schneller zerstört. Im Mittel von insgesamt 30 Versuchsreihen an Diabetikern kann als Zeitpunkt für das Auftreten des Insulinzerstörungseffektes eine Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches von 9.4 Stunden festgelegt werden bei einer Streuung von $\begin{smallmatrix}+4{,}6\\-3{,}4\end{smallmatrix}$, während beim gesunden Menschen je nach den Jahresklassen bis 20 Jahre im Mittel von 10 Einzelversuchsreihen der Insulinzerstörungseffekt bei 28.5 Stunden $\left(\text{Streuung: } \begin{smallmatrix}+3{,}5\\-2{,}5\end{smallmatrix}\right)$ liegt, im Alter von 20—60 Jahren im Mittel von 30 Einzelversuchsreihen bei 22.1 Kontaktstunden $\left(\text{Streuung: } \begin{smallmatrix}+3{,}9\\-6{,}1\end{smallmatrix}\right)$ und im Alter über 60 Jahre im Mittel von 10 Einzelversuchen bei 18,5 Stunden $\left(\text{Streuung: } \begin{smallmatrix}+5{,}5\\-3{,}5\end{smallmatrix}\right)$.

Ein Unterschied in den Inaktivierungszeiten hinsichtlich des Lebensalters hat sich beim Diabetiker nicht feststellen lassen, vielmehr zeigen, wie aus den 30 Versuchsreihen der Tabellen 3 und 4 hervorgeht, die Inaktivierungszeiten beim Zuckerkranken eine bemerkenswerte Konstanz von 8—10 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches.

Diese Feststellung erscheint von besonderem Interesse bei Erwägungen über die Ätiologie des Diabetes mellitus: sie spricht dafür, daß bei der

Zuckerkrankheit nicht allein und immer lediglich die Minderproduktion des Insulins im Pankreas zu berücksichtigen ist, sondern, daß wahrscheinlich außerdem noch eine Noxe im Blut des diabetischen Menschen vorliegt, welche sich im Sinne einer gesteigerten Insulinzerstörung auswirkt. Auf diese interessanten Zusammenhänge wird in einer späteren Arbeit über das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes bei gesunden und diabetischen Nachkommen diabetischer Eltern (8) noch im einzelnen einzugehen sein.

Zusammenfassung.

1. Zur exakteren Bestimmung der insulinzerstörenden Kraft (IZK) des Blutes wird eine Verbesserung der früheren Methodik durch die Anwendung des IZK-Meters beschrieben.

2. Die bisherigen Untersuchungen bei Zuckerkranken umfassen mit den von W. Tochtermann nach dem früheren Untersuchungsgang durchgeführten Versuchen insgesamt 30 Versuchsreihen. Der Insulinzerstörungseffekt des zuckerkranken Blutes liegt nach dem früheren Untersuchungsgang im Mittel von 20 Einzelversuchsreihen bei 9,5 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches $\left(\text{Streuung: } \begin{smallmatrix} + 4{,}5 \\ - 3{,}5 \end{smallmatrix}\right)$; bei 10 mit Hilfe der verbesserten Methodik (IZK-Meter) durchgeführten Versuchsreihen im Mittel bei 8,9 Stunden Kontaktdauer $\left(\text{Streuung: } \begin{smallmatrix} + 1{,}1 \\ - 0.9 \end{smallmatrix}\right)$. Die Insulinzerstörung durch Blut des zuckerkranken Menschen tritt im Mittel von insgesamt 30 Einzelversuchsreihen nach einer Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches von 9,4 Stunden $\left(\text{Streuung: } \begin{smallmatrix} + 4{,}6 \\ - 3{,}4 \end{smallmatrix}\right)$ in Erscheinung.

3. Diese Feststellung einer erheblich beschleunigten Insulinzerstörung durch zuckerkrankes Blut gegenüber der Insulinzerstörung durch gesundes Blut, das unter gleichen Bedingungen eine bestimmte Insulinmenge je nach dem Alter des Probanden erst nach 18–28 Stunden Kontaktdauer zerstört, spricht dafür, daß bei der Zuckerkrankheit nicht allein und immer die Minderproduktion des Insulins im Pankreas zu berücksichtigen ist, sondern, daß wahrscheinlich noch eine Noxe im Blut des Zuckerkranken vorliegt, die sich nach unseren bisherigen Erkenntnissen im Sinne einer erheblich gesteigerten Insulinzerstörung durch das Blut des Diabetikers auswirkt.

Literatur.

1) Die I.—XI. Mitteilung über kristallinisches Insulin wurde in diesem Archiv veröffentlicht: **173**, 431 (1933); **173**, 439 (1933); **173**, 452 (1933); **174**, 118 (1933); **174**, 130 (1933); **178**, 270 (1935); **178**, 282 (1935); **178**, 396 (1935); **182**, 550 (1936); **184**, 77 (1937); **185**, 212 (1937). 2) Bürger, M., u. H. Kohl: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **174**, H. 1/2, 130 (1933). — 3) Kohl, H., H. Selbach, u. A. Janning: Ebenda **185**, H. 2, 212 (1937). — 4) Janning, A.: Diss. Bonn 1938. — 5) Tochtermann, W.: Diss. Bonn 1938. — 6) Bürger, M.: Kongreßbericht Innere Medizin, Wiesbaden 1937. — 7) Kohl, H.: Klin. Wschr., im Druck. — 8) In Vorbereitung.

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in Bonn.
(Direktor: Prof. Dr. F. Tiemann.)

Über kristallinisches Insulin.

XIII. Mitteilung: Untersuchungen über das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft (IZK) des Blutes bei verschiedenen Krankheitszuständen (Carcinom, Hypertonie, Lebercirrhose, Lungentuberkulose, Nieren- und Schilddrüsenerkrankungen*).

Von

H. Kohl, W. Rössel und **F. Schipper.**

(Eingegangen am 18. Dezember 1939.)

In der XII. Mitteilung über kristallinisches Insulin wurde von H. Kohl in diesem Archiv berichtet, daß das Blut des zuckerkranken Menschen unter gleichen Bedingungen eine bestimmte Menge kristallinischen Insulins erheblich schneller inaktiviert als das Blut des gesunden Menschen (1). Während beim Gesunden der Insulinzerstörungseffekt des Blutes je nach dem Lebensalter des Probanden (2) etwa nach 18–28 Kontaktstunden des Blut-Insulingemisches auftritt, konnte das Auftreten des Insulinzerstörungseffektes des zuckerkranken Blutes bereits nach etwa 9 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches festgelegt werden. Da diese Feststellung bei Erwägungen über das Wesen der Zuckerkrankheit gerade in ätiologischer Hinsicht von großer Wichtigkeit erscheint, wurden in der XII. Mitteilung von H. Kohl mittels einer verbesserten Methodik (IZK-Meter) frühere eigene Beobachtungen sowie auch die in Fortsetzung dieser Untersuchungen von W. Tochtermann (3) erhobenen Befunde bei Diabetiker durch weitere Versuchsreihen an Diabetikern ergänzt; im Mittel von 30 Einversuchsreihen konnte festgestellt werden, daß für das Auftreten des Insulinzerstörungseffektes des diabetischen Blutes eine Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches von 9,4 Stunden $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix} +4{,}6 \\ -3{,}4 \end{matrix}\right)$ anzunehmen ist.

Die insulinzerstörende Kraft des Diabetikerblutes ist also gegenüber der insulinzerstörenden Kraft des gesunden Blutes erheblich gesteigert. Nach dieser Feststellung erschien als nächste wichtige Aufgabe, experimentelle Unterlagen zu schaffen zur Beantwortung der Frage: wie verhält sich die insulinzerstörende Kraft des Blutes bei anderen Krankheitszuständen? Bereits frühere, gemeinsam mit M. Bürger durchgeführte Untersuchungen (4) hatten gezeigt, daß Blut von Kranken mit Leukämie

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, der an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Insulin viel schneller zerstört als gesundes Blut und nach unseren jetzigen Erfahrungen auch schneller als zuckerkrankes Blut; von besonderer Bedeutung erscheint aber die Feststellung, daß das leukocytenüberreiche Blut des Leukämikers (Leukocyten über 120000) seine erheblich gesteigerte insulinzerstörende Kraft - Insulinzerstörungseffekt tritt schon nach etwa 2 Stunden Kontaktdauer auf - wieder weitgehend einbüßt, wenn durch therapeutische Röntgenbestrahlungen die Leukocytenzahlen des Leukämiekranken erheblich herabgesetzt wurden. An diese Beobachtung knüpfen M. Bürger und H. Kohl die Vorstellung, daß die Leukocyten die eigentlichen Träger der insulinzerstörenden Kraft des Blutes sind.

Zur Beantwortung der Fragestellung über das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes bei den verschiedensten Krankheitszuständen haben wir die IZK des Blutes von folgenden Kranken geprüft: Kranke mit Lungentuberkulose, Carcinomkranke, Hypertoniker, Nieren- und Schilddrüsenkranke sowie Kranke mit Lebercirrhose; es wurden insgesamt 32 Patienten untersucht. Hinsichtlich der angewendeten Methodik ist zu bemerken, daß sämtliche Einzelversuchsreihen, insgesamt 110, nach der durch den IZK-Meter verbesserten Methodik (5) durchgeführt wurden: vor Beginn eines jeden Einzelversuches wurde eine Leukocytenzählung vorgenommen, um die Möglichkeit auszuschalten, daß eine eventuelle Steigerung der insulinzerstörenden Kraft durch eine stärkere Leukocytose des Blutes bedingt sein konnte.

Versuchsergebnisse.

Im folgenden werden die Versuchsergebnisse entsprechend der alphabetischen Reihenordnung der einzelnen untersuchten Erkrankungsgruppen beschrieben; die experimentellen Befunde beim Krankheitsbild der Lebercirrhose werden gesondert am Schluß der Arbeit besprochen. Die Wiedergabe der Versuchsergebnisse wird so vorgenommen, daß von jeder Krankheitsgruppe tabellarisch ein Einzelversuch und zugleich die Mittelwerte sämtlicher bei der betreffenden Gruppe durchgeführten Versuchsreihen wiedergegeben werden.

I. Carcinomkranke.

Die Bestimmung der insulinzerstörenden Kraft des Blutes wurde an 6 Carcinomkranken vorgenommen; es handelte sich um 2 männliche Patienten mit Prostatacarcinom im Alter von 71 und 35 Jahren, um 2 männliche Patienten mit Rectumcarcinom im Alter von 76 und 64 Jahren, um einen 59jährigen Patienten mit Lippencarcinom und um eine 57jährige Patientin mit Magencarcinom. In der Tabelle 1 ist ein Einzelversuch wiedergegeben, der das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes von einem 76jährigen Patienten mit Rectumcarcinom veranschaulicht. Die Rubrik Nr. 3 gibt über die Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches

in Stunden Auskunft bis zum Auftreten des Insulinzerstörungseffektes, der in Rubrik Nr. 10 wiedergegeben ist.

Tabelle 1. Normale insulinzerstörende Kraft des Blutes bei Carcinomkranken.

Diagnose: Rectumcarcinom. Blutspender: männlich, Alter: 76 Jahre, Leukocyten: 5600.

1. Kaninchen Nr.	106	107	108
2. Kaninchengewicht in g	2050	2500	1900
3. Kontaktdauer: Insulin + Blut in Std.	16	18	21
4. Kaninchenblutzucker in mg% :			
5. vor der intraperitonealen Injektion	98	99	88
6. nach $^1/_2$ Std.	56	95	89
7. „ 1 „	63	104	93
8. „ $1^1/_2$ „	67	93	95
9. „ 2 „	69	100	84
10. Insulinzerstörungseffekt	0	+	+
11. IZK-Mittelwert von 6 Carcinomkranken im Alter von 35 bis 76 Jahren	bei 19,8 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 2,3; − 1,8		
12. IZK-Mittelwert von 5 Carcinomkranken im Alter von 57 bis 76 Jahren	bei 19,8 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 2,2; − 1,8		
13. IZK-Normal-Mittelwert über 60 Jahren	bei 18,5 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 5,5; − 3,5		
14. Insulinzerstörungseffekt bei 1 Carcinomkranken im Alter von 35 Jahren	bei 20 Stunden Kontaktdauer,		
15. IZK-Normal-Mittelwert zwischen 20 und 60 Jahren	bei 22,1 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 3,9; − 6,1		

Es zeigt sich, daß der Insulinzerstörungseffekt bei diesem Kranken mit Rectumcarcinom nach 18 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches in Erscheinung tritt; dieser Wert entspricht der normalen Insulinzerstörungsdauer durch das Blut des gesunden Menschen in der Altersstufe über 60 Jahre; der Normal-Mittelwert von 10 gesunden Probanden in dieser Altersstufe liegt nach den Untersuchungen von H. Kohl, H. Selbach und A. Janning (2) bei 18,5 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches mit einer Streuung von $\begin{matrix}+5{,}5\\-3.5\end{matrix}$ (Rubrik Nr. 13).

Ferner ist aus der Tabelle 1 der aus 6 Einzelversuchsreihen bei Carcinomkranken errechnete Mittelwert der Insulinzerstörungsdauer durch Blut in dem Lebensalter von 35—76 Jahren ersichtlich; dieser Mittelwert liegt bei 19,8 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches mit einer Streuung von $\begin{matrix}+2{,}3\\-1.8\end{matrix}$ (Rubrik Nr. 11); der von 5 Carcinomkranken im Alter von 57—76 Jahren errechnete Mittelwert liegt ebenfalls bei 19,8 Kontaktstunden mit einer Streuung $\begin{matrix}+2{,}2\\-1.8\end{matrix}$ (Rubrik Nr. 12).

Da nach früheren Untersuchungen (2) die Insulin-Inaktivierungszeiten für die einzelnen Altersgruppen: bis 20 Jahren, von 20—60 Jahren und über 60 Jahren festgelegt sind, wurde in Rubrik Nr. 14 bei einem jüngeren Patienten im Alter von 35 Jahren der Zeitpunkt des Auftretens des Insulinzerstörungseffektes gesondert angeführt. Es zeigt sich, daß die Insulin-Inaktivierungsdauer bei diesem Kranken mit Rectumcarcinom im Alter von 35 Jahren bei einer Kontaktdauer von 20 Stunden liegt; der entsprechende Normal-Mittelwert von 30 gesunden Probanden für diese Altersklasse liegt bei 22,1 Stunden Kontaktdauer mit einer Streuung von $\begin{matrix}+3{,}9\\-6{,}1\end{matrix}$ (Rubrik Nr. 15).

Demnach zeigt das zeitliche Auftreten des Insulinzerstörungseffektes des Blutes von Carcinomkranken von dem Normal-Mittelwert beim gesunden Menschen in derselben Jahresklasse keine nennenswerte Abweichung.

II. Hypertoniekranke.

Im weiteren haben wir die insulinzerstörende Kraft des Blutes von 6 Kranken mit Hypertonie geprüft; es handelt sich um 4 männliche und um 2 weibliche Patienten im Alter von 52 68 Jahren mit genuiner Hypertonie; die Blutdruckwerte nach Riva Rocci lagen zwischen 230/100 und 200/125 mm Hg. Die Leukocytenzahlen hielten sich in normalen Grenzen. In der Tabelle 2 ist in derselben Anordnung wie in Tabelle 1 die Insulin-

Tabelle 2. Das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes bei Hypertoniekranken.

Diagnose: essentielle Hypertonie, RR = 220/100. Blutspender: weiblich, Alter: 62 Jahre, Leukocyten: 6800.

1. Kaninchen Nr.	91	92	93	94
2. Kaninchen-Gewicht in g	1800	2100	1850	1600
3. Kontaktdauer: Insulin + Blut in Std.	16	18	20	22
4. Kaninchenblutzucker in mg%				
5. vor der intraperitonealen Injektion	87	89	107	88
6. nach ½ Std.	87	87	87	92
7. „ 1 „	64	66	71	96
8. „ 1½ „	66	68	60	98
9. „ 2 „	69	73	69	96
10. Insulinzerstörungseffekt	0	0	0	+
11. IZK-Mittelwert von 6 Hypertonikern im Alter von 52 bis 68 Jahren	bei 23 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 1; — 3			
12. IZK-Mittelwert von 4 Hypertonikern im Alter von 62 bis 68 Jahren	bei 22,5 Stunden Kontaktdauer, Streuung: +1,5; 2,5			
13. IZK-Mittelwert von 2 Hypertonikern im Alter von 52 und 53 Jahren	bei 24 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 0; — 0			
14. IZK-Normal-Mittelwert über 60 Jahre	bei 18,5 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 5,5; — 3,5			
15. IZK-Normal-Mittelwert zwischen 20 und 60 Jahren	bei 22,1 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 3,9; — 6,1			

Inaktivierungszeit in einem Einzelversuch wiedergegeben; ferner ist der Mittelwert von 6 Einzelversuchsreihen unter Berücksichtigung des Lebensalters in seiner Beziehung zum Normal-Mittelwert der Insulin-Inaktivierungszeit des Blutes von gesunden Probanden berücksichtigt.

Der Insulinzerstörungseffekt des Blutes von Hypertoniekranken tritt, wie aus der Rubrik 3 und 10 des Einzelversuchs an einer 62jährigen Patientin mit einem Hochdruck von 220/100 mm Hg hervorgeht, nach einer Kontaktdauer von 22 Stunden in Erscheinung. Der Normal-Mittelwert von 10 gesunden Probanden in derselben Jahresklasse über 60 Jahre liegt bei 18,5 Kontaktstunden mit einer Streuung von $\begin{matrix}+5{,}5\\-3{,}5\end{matrix}$ (Rubrik 14). Bei 3 weiteren Hypertoniekranken im Alter über 60 Jahren trat der Insulinzerstörungseffekt in zwei Fällen nach 24 Stunden, in einem Falle nach 20 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches auf; in der niedrigeren Altersstufe unter 60 Jahren lag der Insulinzerstörungseffekt bei 2 Hypertoniekranken im Alter von 52 und 53 Jahren in beiden Fällen bei einer Kontaktdauer von 24 Stunden (Rubrik 13); der Normal-Mittelwert von 30 gesunden Probanden in dieser Jahresklasse von 20–60 Jahren liegt bei 22,1 Stunden Kontaktdauer mit einer Streuung von $\begin{matrix}+3{,}9\\-6{,}1\end{matrix}$ (Rubrik 15).

Es zeigt sich also, daß die Zeitwerte des Auftretens des Insulinzerstörungseffektes bei Hypertoniekranken in der Jahresklasse über 60 Jahre (Rubrik 12) mit 22,5 Kontaktstunden $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix}+1{,}5\\-2{,}5\end{matrix}\right)$ und der Jahresklasse unter 60 Jahren (Rubrik 13) mit 24 Kontaktstunden ohne Streuung mit den in den Rubriken 14 und 15 wiedergegebenen Normal-Mittelwerten bei Berücksichtigung der Streuung gleichzusetzen sind.

Demnach entspricht das Auftreten des Insulinzerstörungseffektes des Blutes von Hypertoniekranken der Norm.

III. Kranke mit Lungentuberkulose.

Es folgen in derselben tabellarischen Anordnung die bei 6 Kranken mit Lungentuberkulose erhobenen Befunde; es kamen durchweg Patienten mit schweren Formen von Lungentuberkulose zur Untersuchung. In der Tabelle 3 ist zunächst wieder ein Einzelversuch an einem Kranken mit schwerer Lungentuberkulose wiedergegeben; ebenfalls sind mit der jeweiligen Streuung die Mittelwerte in den verschiedenen Altersstufen der untersuchten Kranken in gesonderten Rubriken angeführt sowie die betreffenden Normal-Mittelwerte der untersuchten Altersklassen.

Der Einzelversuch an einem 22jährigen Patienten mit beiderseitiger exsudativer Lungentuberkulose zeigt, daß der Insulinzerstörungseffekt nach einer Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches von 22 Stunden auftritt (Rubrik 3 und 10). Dieser Wert entspricht der normalen Insulin-

Tabelle 3. Normale insulinzerstörende Kraft des Blutes bei Kranken mit Lungentuberkulose.

Diagnose: beiderseitige exsudative Lungentuberkulose. Blutspender: männlich, Alter: 22 Jahre, Leukocyten: 8600.

1. Kaninchen Nr.	120	121	122
2. Kaninchengewicht in g	1850	2000	1850
3. Kontaktdauer: Insulin + Blut in Std.	20	22	24
4. Kaninchenblutzucker in mg% :			
5. vor der intraperitonealen Injektion	95	86	88
6. nach $^1/_2$ Std.	81	109	104
7. „ 1 „	77	100	104
8. „ $1^1|_2$ „	64	115	100
9. „ 2 „	79	106	115
10. Insulinzerstörungseffekt	0	+	+
11. IZK-Mittelwert von 6 Lungentuberkulösen im Alter von 16 bis 37 Jahren	bei 24 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 4; − 3		
12. IZK-Mittelwert von 2 Lungentuberkulösen im Alter unter 20 Jahren	bei 27,5 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 0,5; − 0,5		
13. IZK-Mittelwert von 4 Lungentuberkulösen im Alter zwischen 20 und 60 Jahren	bei 22,5 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 2,5; − 1,5		
14. IZK-Normal-Mittelwert unter 20 Jahren	bei 28,5 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 3,5; − 2,5		
15. IZK-Normal-Mittelwert zwischen 20 und 60 Jahren	bei 22,1 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 3,9; − 6,1		

zerstörungsdauer durch das Blut gesunder Probanden, denn der Normal-Mittelwert in der Altersklasse von 20–60 Jahren (Rubrik 15) liegt bei 22,1 Stunden Kontaktdauer $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix} +3{,}9 \\ -6{,}1 \end{matrix}\right)$. Der aus 6 Einzelversuchsreihen an Kranken mit Lungentuberkulose im Alter von 16–37 Jahren errechnete Mittelwert der Insulinzerstörungsdauer liegt bei 24 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches mit einer Streuung von $\begin{matrix} +4 \\ -3 \end{matrix}$ (Rubrik 11); wenn bei diesen Kranken die einzelnen Altersgruppen berücksichtigt werden, so zeigt sich bei 2 Patienten im Alter unter 20 Jahren in Rubrik 12 eine Inaktivierungsdauer von im Mittel 27,5 Stunden $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix} +0{,}5 \\ -0{,}5 \end{matrix}\right)$ und im Mittel bei 4 Patienten zwischen 20 und 60 Jahren in Rubrik 13 eine Inaktivierungsdauer von 22,5 Stunden Kontaktdauer $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix} +2{,}5 \\ -1{,}5 \end{matrix}\right)$; werden diese Werte mit den in den Rubriken 15 und 14 wiedergegebenen Normal-Mittelwerten zwischen 20 und 60 Jahren von 22,1 Stunden $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix} +3{,}9 \\ -6{,}1 \end{matrix}\right)$ und unter 20 Jahren von 28,5 Stunden Kontaktdauer $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix} +3{,}5 \\ -2{,}5 \end{matrix}\right)$ verglichen, so ergibt sich für die Insulinzerstörungsdauer durch Blut von Kranken mit Lungentuberkulose keine

Abweichung von der Norm. Die insulinzerstörende Kraft des Blutes von Kranken mit Lungentuberkulose ist also die gleiche wie die des gesunden Menschen.

IV. Nierenkranke.

Es kamen 4 Patienten mit Nierenerkrankungen im Alter von 22 bis 60 Jahren zur Untersuchung; von 3 Krankheitsfällen mit chronischer Nephritis lag bei einem 60jährigen Patienten mit Hypertonie eine Nephrosklerose vor; der Blutdruck betrug nach Riva Rocci 200/105 mm Hg; beim vierten Krankheitsfall handelte es sich um eine chronische hämorrhagische Pyelonephritis nach linksseitiger Nephrektomie wegen Pyonephrose.

Tabelle 4. Normale insulinzerstörende Kraft des Blutes bei Nierenkranken.

Diagnose: chronische Nephritis; RN = 31 mg%, RR = 120/80. Blutspender: männlich, Alter: 22 Jahre, Leukocyten: 4300.

1. Kaninchen Nr.	97	99	100
2. Kaninchengewicht in g	1950	1850	1875
3. Kontaktdauer: Insulin + Blut in Std.	18	20	22
4. Kaninchenblutzucker in mg%:			
5. vor der intraperitonealen Injektion	95	102	95
6. nach $^1/_2$ Std.	80	102	110
7. „ 1 „	74	97	108
8. „ $1^1/_2$ „	70	92	111
9. „ 2 „	72	90	111
10. Insulinzerstörungseffekt	0	0	+
11. IZK-Mittelwert von 4 Nierenkranken im Alter von 22 bis 60 Jahren	bei 22,7 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 1,3; — 0,7		
12. IZK-Normal-Mittelwert zwischen 20 und 60 Jahren	bei 22,1 Stunden Kontaktdauer, Streuung: 3,9; — 6,1		

Die Tabelle 4 zeigt im Einzelversuch die Insulinzerstörungsdauer des Blutes von einem 22jährigen Patienten mit chronisch-rezidivierender Nephritis ohne Reststickstoff-Erhöhung mit normalem Blutdruck. Der aus den 4 Einzelversuchen errechnete Mittelwert der Insulin-Inaktivierungsdauer sowie der Normal-Mittelwert der betreffenden Jahresklasse ist in Rubrik 11 und 12 berücksichtigt. Aus dem Einzelversuch ist ersichtlich, daß der Insulinzerstörungseffekt bei dem 22jährigen Patienten mit chronischer Nephritis in der 22. Kontaktstunde in Erscheinung tritt (Rubrik 3 und 10); er entspricht also dem in Rubrik 12 wiedergegebenen Normalwert von 22,1 Stunden Kontaktdauer $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix} +3{,}9 \\ 6{,}1 \end{matrix}\right)$, ebenso wie der aus den 4 Einzelversuchen errechnete Mittelwert von 22,7 Kontaktstunden mit einer Streuung von $\begin{matrix} +1{,}3 \\ -0{,}7 \end{matrix}$ (Rubrik 11).

Es läßt sich also sagen, daß die insulinzerstörende Kraft des Blutes von 4 Kranken mit chronischer Nephritis, Nephrosklerose und chronisch hämorrhagischer Pyelonephritis in Kontaktstunden des Blut-Insulingemisches gemessen die gleiche ist wie beim gesunden Menschen in derselben Jahresklasse.

V. Schilddrüsenkranke.

Es folgen in Tabelle 5 die Untersuchungsergebnisse von 5 Schilddrüsenkranken; es kamen 1 männlicher und 2 weibliche Patienten im Alter von 20, 45 und 48 Jahren mit Thyreotoxikose (Grundumsatzsteigerung bei + 25 %) und 2 weibliche Patienten mit Morbus Basedow (Grundumsatzsteigerung bei + 60—70 % im Alter von 53 und 63 Jahren zur Untersuchung.

Tabelle 5. Normale insulinzerstörende Kraft des Blutes bei Schilddrüsenkranken.

Diagnose: Morbus Basedow, Grundumsatz: + 53 %. Blutspender: weiblich, Alter: 53 Jahre, Leukocyten 8400.

1. Kaninchen Nr.	120	121	123
2. Kaninchengewicht in g	1850	1900	1900
3. Kontaktdauer: Insulin + Blut in Std.	19	21	23
4. Kaninchenblutzucker in mg%:			
5. vor der intraperitonealen Injektion	103	105	93
6. nach ½ Std.	94	82	89
7. „ 1 „	69	78	91
8. „ 1½ „	66	84	87
9. „ 2 „	71	85	90
10. Insulinzerstörungseffekt	0	0	+
11. IZK-Mittelwert von 5 Schilddrüsenkranken im Alter von 20 bis 63 Jahren	bei 23,4 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 2,6; − 2,4		
12. IZK-Mittelwert von 4 Schilddrüsenkranken im Alter von 20 bis 53 Jahren	bei 23,2 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 2,8; − 2,2		
13. IZK-Mittelwert von 1 Schilddrüsenkranken im Alter von 63 Jahren	bei 24 Stunden Kontaktdauer,		
14. IZK-Normal-Mittelwert zwischen 20 und 60 Jahren	bei 22,1 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 3,9; − 6,1		
15. IZK-Normal-Mittelwert über 60 Jahre	bei 18,5 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 5,5; − 3,5		

Die Tabelle 5 zeigt im Einzelversuch an einer 53jährigen weiblichen Patientin mit Morbus Basedow das Auftreten des Insulinzerstörungseffektes nach einer Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches von 23 Stunden (Rubrik 3 und 10). Der aus 5 Einzelversuchsreihen an Schilddrüsenkranken errechnete Mittelwert der Blut-Insulinkontaktdauer bis zur Insulinzerstörung (3 Kranke mit Thyreotoxikose, 2 Kranke mit Morbus Basedow) liegt bei einem Alter der Versuchspersonen von 20—63 Jahren bei 23,4 Kontaktstunden mit einer Streuung von $\begin{matrix}+2{,}6\\-2{,}4\end{matrix}$ (Rubrik 11).

In Rubrik 12 ist der IZK-Mittelwert von 4 Schilddrüsenkranken im Alter von 20–53 Jahren mit 23,2 Stunden Kontaktdauer $\left(\text{Streuung: } \begin{matrix} +2{,}8 \\ -2{,}2 \end{matrix}\right)$ und in Rubrik 13 der IZK-Mittelwert von einer Schilddrüsenkranken im Alter von 63 Jahren mit 24 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches wiedergegeben. Der Normal-Mittelwert beim Gesunden in der Altersklasse von 20—60 Jahren liegt mit einer Streuung von $\begin{matrix} +3{,}9 \\ -6{,}1 \end{matrix}$ bei 22,1 Kontaktstunden und der Normal-Mittelwert der IZK beim Gesunden über 60 Jahre bei 18.5 Stunden Kontaktdauer mit einer Streuung von $\begin{matrix} +5{,}5 \\ -3{,}5 \end{matrix}$ (Rubrik 14 und 15).

Bei Berücksichtigung der Streuung zeigt ein Vergleich der Insulin-Inaktivierungszeiten des Blutes von 5 Schilddrüsenkranken mit den Insulin-Inaktivierungszeiten des Blutes von Gesunden in denselben Jahresklassen keine Abweichung.

VI. Das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes bei Kranken mit Lebercirrhose.

Die insulinzerstörende Kraft des Blutes von Kranken mit Lebercirrhose wurde an 6 Lebercirrhotikern im Alter von 34—68 Jahren geprüft; von diesen 6 Patienten standen 3 Probanden im Alter von 34, 56 und 57 Jahren, die 3 anderen Patienten im Alter von 62, 66 und 68 Jahren.

Tabelle 6. Das Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes bei Kranken mit Lebercirrhose.

Diagnose: Lebercirrhose. Blutspender: männlich, Alter: 68 Jahre, Leukocyten: 6000.

1. Kaninchen Nr.	94	95	96	97	98
2. Kaninchengewicht in g	2400	2250	2550	2100	2250
3. Kontaktdauer: Insulin + Blut in Std.	24	26	28	30	32
4. Kaninchenblutzucker in mg % :					
5. vor der intraperitonealen Injektion	82	75	112	73	66
6. nach $^1/_2$ Std.	68	41	66	68	69
7. „ 1 „	44	59	75	78	73
8. „ $1^1/_2$ „	—	60	100	87	87
9. „ 2 „	—	64	77	82	82
10. Insulinzerstörungseffekt	0	0	0	+	+
11. IZK-Mittelwert von 6 Kranken mit Lebercirrhose im Alter von 34 bis 68 Jahren	bei 29,3 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 2,7; — 4,3				
12. IZK-Mittelwert von 3 Kranken mit Lebercirrhose im Alter von 34 bis 57 Jahren	bei 29 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 3; — 4				
13. IZK-Mittelwert von 3 Kranken mit Lebercirrhose im Alter von 60 bis 68 Jahren	bei 29,6 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 0,4; — 0,6				
14. IZK-Normal-Mittelwert zwischen 20 und 60 Jahren	bei 22,1 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 3,9; — 6,1				
15. IZK-Normal-Mittelwert über 60 Jahre	bei 18,5 Stunden Kontaktdauer, Streuung: + 5,5; — 3,5				

In der Tabelle 6 ist ein Einzelversuch an einem 68jährigen männlichen Patienten mit Lebercirrhose und Ascites wiedergegeben, ferner sind in derselben Anordnung wie in den anderen Tabellen die Mittelwerte der Blut-Insulinkontaktdauer bis zum Auftreten des Insulinzerstörungseffektes unter Berücksichtigung der einzelnen Altersklassen von 20 bis 60 Jahren (Rubrik 12) und über 60 Jahre (Rubrik 13) zum Vergleich mit den Normal-Mittelwerten in denselben Altersstufen angeführt (Rubrik 14 und 15).

Bei dem 68jährigen Kranken mit Lebercirrhose trat der Insulinzerstörungseffekt des Blutes nach einer Blut-Insulinkontaktdauer von 30 Stunden in Erscheinung (Einzelversuch, Rubrik 3 und 10); bei dem zweiten Patienten in derselben Altersstufe über 60 Jahren im Alter von 66 Jahren wurde der Insulinzerstörungseffekt ebenfalls nach einer Kontaktdauer von 30 Stunden festgestellt; der dritte Patient in dieser Altersstufe stand im Alter von 62 Jahren; bei diesem Patienten trat der Insulinzerstörungseffekt nach 29 Kontaktstunden auf. In der Rubrik 13 ist der Mittelwert der Insulin-Inaktivierungsdauer von diesen 3 Patienten mit Lebercirrhose in der Altersstufe über 60 Jahre wiedergegeben; er beträgt 29,6 Kontaktstunden bei einer Streuung von $\begin{matrix}+\,0{,}4\\-\,0{,}6\end{matrix}$. Der in Rubrik 15 wiedergegebene Normal-Mittelwert der Insulin-Inaktivierungsdauer des Blutes von gesunden Probanden in derselben Altersstufe beträgt 18,5 Kontaktstunden mit einer Streuung von $\begin{matrix}+\,5{,}5\\-\,3{,}5\end{matrix}$; es zeigt sich also auch bei Berücksichtigung der Streuung, daß der Insulinzerstörungseffekt des Blutes von 3 Kranken mit Lebercirrhose in der Altersstufe über 60 Jahre gegenüber dem Insulinzerstörungseffekt des Blutes vom gesunden Menschen in derselben Jahresklasse mit einer Verzögerung auftritt; die Differenz zwischen den Streuungswerten beim gesunden Menschen einerseits (Rubrik 15) und beim Lebercirrhotiker andererseits (Rubrik 13) beträgt 4 Stunden, die Differenz der Mittelwerte dagegen 11,1 Stunden.

Aus der Altersgruppe von 20—60 Jahren kamen 2 weibliche Patienten im Alter von 34 und 56 Jahren und 1 männlicher Patient im Alter von 57 Jahren zur Untersuchung; bei diesem 57jährigen Kranken mit Lebercirrhose wurde der Insulinzerstörungseffekt erst nach 32 Stunden, bei der 34jährigen Patientin nach 30 Stunden, dagegen bei der 56jährigen Patientin bereits schon nach 25 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches beobachtet. Die Mittelwerte der Inaktivierungszeiten liegen in der Altersstufe zwischen 20 und 60 Jahren bei 29 Kontaktstunden mit einer Streuung von $\begin{matrix}+\,3\\-\,4\end{matrix}$ (Rubrik 12); der Normal-Mittelwert für diese Jahresklasse von 20—60 Jahren dagegen mit einer Streuung von $\begin{matrix}+\,3{,}9\\-\,6{,}1\end{matrix}$ bei 22.1 Stunden Kontaktdauer des Blut-Insulingemisches (Rubrik 14).

Es zeigt sich also auch in dieser Altersstufe von 20–60 Jahren bei Vergleich der Mittelwerte vom gesunden Menschen und von 3 Kranken mit Lebercirrhose eine Verzögerung von 6,9 Stunden im Auftreten des Insulinzerstörungseffektes beim Kranken mit Lebercirrhose, die aber bei Berücksichtigung der Streuungszahlen in dieser Jahresklasse nicht so deutlich in Erscheinung tritt wie in der Jahresklasse über 60 Jahre.

Wenn auch die Anzahl der Untersuchungen an Kranken mit Lebercirrhose gegenüber den zahlenmäßig weit umfangreicheren Untersuchungen an gesunden Probanden gering ist, so sprechen sie doch mit großer Wahrscheinlichkeit dafür, daß bei dem Krankheitsbild der Lebercirrhose die insulinzerstörende Kraft des Blutes gegenüber der insulinzerstörenden Kraft des Blutes vom gesunden Menschen wesentlich herabgesetzt ist.

Diese Beobachtung ist noch durch weitere umfangreiche Reihenuntersuchungen an Kranken mit Lebercirrhose nachzuprüfen, denn die Bestätigung dieser Feststellung einer Herabsetzung der IZK des Blutes beim Krankheitsbild der Lebercirrhose wäre ein wichtiger Beitrag zur Klärung der Vorstellungen über das Wesen der insulinzerstörenden Kraft des Blutes, die wir bis heute als einen noch unbekannten Faktor des Blutes betrachten müssen und von der wir auf Grund gemeinsam mit M. Bürger durchgeführten früheren Untersuchungen (4) annehmen können, daß sie einmal den Leukocyten des Blutes anhaftet und daß sie einen Fermentcharakter trägt. Für einen Fermentcharakter der IZK des Blutes spricht die Tatsache, daß das menschliche Blut seine insulinzerstörende Kraft verliert, wenn es längere Zeit auf eine Temperatur von 56° gebracht wurde (4).

Eine erhebliche Abschwächung der insulinzerstörenden Kraft des Blutes beim Krankheitsbild der Lebercirrhose, bei welchem das funktionstüchtige Leberparenchym größtenteils durch Bindegewebe ersetzt ist, würde die Vorstellung begründen, daß für ein normales Verhalten der insulinzerstörenden Kraft des Blutes auch eine normale Leberfunktion erforderlich ist; diese Vorstellung würde dann zwangsläufig auf eine wichtige Rolle der Leber bei der Bildung der insulinzerstörenden Kraft des Blutes hinweisen.

Zusammenfassung.

1. Die Untersuchungen an Patienten mit Carcinom, Hypertonie, Lungentuberkulose, Nieren- und Schilddrüsenerkrankungen haben gezeigt, daß die insulinzerstörende Kraft des Blutes dieser Kranken hinsichtlich der Intensität von der insulinzerstörenden Kraft des Blutes gesunder Menschen nicht nennenswert abweicht.

2. Die Untersuchungen an 6 Kranken mit Lebercirrhose ergaben im Auftreten des Insulinzerstörungseffektes eine Abweichung von der Norm; bei diesen Kranken wurde eine Verzögerung im Auftreten des Insulinzerstörungseffektes beobachtet, welche besonders deutlich in der Altersstufe über 60 Jahre in Erscheinung tritt. Diese Beobachtung könnte

für eine wesentliche Abschwächung der insulinzerstörenden Kraft des Blutes beim Krankheitsbild der Lebercirrhose sprechen.

3. Die Notwendigkeit weiterer systematischer Untersuchungen der IZK des Blutes beim Krankheitsbild der Lebercirrhose wird begründet, da durch Bestätigung dieser Befunde ein Weg eröffnet würde, weitere wichtige Erkenntnisse über das Wesen der insulinzerstörenden Kraft des Blutes zu schaffen.

Literatur.

1) Kohl, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 452 (1940). — 2) Kohl, H., H. Selbach, u. A. Janning: Ebenda **185**, 212 (1937). — 3) Tochtermanns W.: Diss. Bonn 1937. — 4) Bürger, M., u. H. Kohl: Naunyn-Schmiedeberg, Arch. **174**, 130 (1933). — 5) Kohl, H.: Klin Wschr., im Druck.

Mitteilung aus der I. medizinischen Klinik der kgl. ung. Peter Pázmány Universität in Budapest. (Vorstand: Prof. Franz Herzog.)

Beitrag zum Mechanismus der blutdrucksteigernden Wirkung des Hypophysenhinterlappenhormons.

Von

Dr. **Paul v. Marsovszky jun.**

(Eingegangen am 4. Januar 1940.)

Die blutdrucksteigernde Wirkung des Hypophysenhinterlappen-(HHL)-Hormons ist seit den grundlegenden Versuchen von Oliver und Schäfer (1), sowie Howell (2) gut bekannt. Obwohl die Entdeckung dieser blutdrucksteigernden Wirkung selbst auf das Ende des vorigen Jahrhunderts zurückreicht, ist der Entstehungsmechanismus derselben noch immer nicht ganz geklärt. Wir wissen zwar aus mehreren Versuchen, daß die Blutdruckerhöhung infolge eines an der Übergangsstelle der Arteriolen und Kapillaren auftretenden Spasmus entsteht [Trendelenburg (3), Geiling-Herrick-Essex (4)], ob aber dieser Spasmus infolge direkter Muskelwirkung oder durch eine Funktionsänderung des Nervensystems bzw. der Nebennieren hervorgerufen wird, ist noch immer nicht sicher entschieden. So soll nach Brouha und Simonnet (5) in Anbetracht dessen, daß die Wirkung auch an denervierten Organen entsteht, das HHL-Hormon wahrscheinlich direkt auf die Muskulatur der Gefäße wirken. Demgegenüber dachte Leimdörfer (6) bereits 1936 an eine im Wege des Nervensystems entstehende Wirkung, da er bei intralumbaler Verabreichung einen stärkeren Effekt fand als bei intravenösen Gaben. Für die Richtigkeit seiner Annahme scheinen auch die Beobachtungen von Heller und Kusunoki (7) zu sprechen, bei deren Versuchen der Blutdruck nach intrazysternaler Anwendung ebenso rasch anstieg wie nach intravenöser Verabreichung. Spiegel und Inaba (8) fanden jedoch unter dem Einfluß des in die Zysterne oder in die IV. Hirnkammer eingeführten HHL-Hormons niemals eine Blutdrucksteigerung, in einem Teil der Fälle ist der Blutdruck sogar gesunken. In ähnlicher Weise fand Cushing (9) beim Menschen nach Einführung von Pituitrin in die Hirnkammern nach anfänglichem Sinken des Blutdrucks nur einen vorübergehenden Anstieg, welcher wieder von einer Blutdrucksenkung abgelöst wurde. Mit der Rolle der Nebennieren im Mechanismus der blutdrucksteigernden Wirkung des HHL hat sich zuerst Elliot (10) beschäftigt. Nach seinen Angaben ist bei epinephrektomierten Tieren gar keine Blutdruckerhöhung entstanden, während die Blutdrucksteigerung unter dem Einfluß von Adrenalin auch nach Adrenalektomie unverändert vorhanden war. In anderen Versuchen fand Elliot (11) wieder, daß nach Verabreichung von HHL Hormon der Adrenalingehalt

der Nebennieren nicht abnimmt. Demnach scheint also eine gesteigerte Absonderung von Adrenalin unter Pituitrinwirkung nicht wahrscheinlich zu sein. Auf Grund dieser letzten Angaben von Elliot verneint Börner (12) die Annahme, daß die blutdrucksteigernde Wirkung des HHL-Hormons auf einer gesteigerten Adrenalinausschüttung der Nebennieren beruhen würde.

Diese widersprechenden Literaturangaben bzw. der Umstand, daß die Wirkung der rein pressorischen Fraktion des HHL-Hormons (Vasopressin) in dieser Hinsicht noch nicht untersucht wurde, veranlaßte mich zur Prüfung der Frage, ob die Nebennieren an der blutdrucksteigernden Wirkung des Vasopressins beteiligt sind bzw. ob die Entfernung der Nebennieren die blutdrucksteigernde Wirkung des Vasopressins beeinflußt.

Methodik.

Die Versuche wurden in zwei Gruppen ausgeführt. An acht gesunden Katzen mit normalen Nebennieren wurde in Rein-Schneiderscher (13) Pernoktonbetäubung der Vagus durchschnitten, künstliche Atmung eingeleitet und eine Dezerebrierung vorgenommen. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurde Heparin (Hoffmann-La Roche) benutzt (0,5 mg pro kg Körpergewicht in physiologischer NaCl-Lösung intravenös eingespritzt). Das Tonephin (Bayer) wurde mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt in die Vena femoralis gespritzt, wenn der Blutdruck bereits beständig geworden war. Das Gewicht der Tiere schwankte zwischen 2,2 und 4,0 kg. In der Gruppe der anderen 12 Tiere wurde ebenfalls in Pernoktonnarkose mit einem Medianschnitt am Rücken eine Epinephrektomie ausgeführt. Bei dem Tier Nr. 12 wurde der Versuch erst 3 Tage nach der Operation ausgeführt, bei den anderen Tieren 1 Stunde nach der Epinephrektomie. Der größere Teil der Tiere ertrug, wenn nach der Epinephrektomie noch 1—3 Tage gewartet wurde, den weiteren Eingriff in diesem Zustande nicht und die Versuche mußten deshalb unmittelbar nach der Epinephrektomie ausgeführt werden.

In der ersten Gruppe (Tabelle 1) erhielten 4 Tiere 5 Voegtlin-Einheiten (V. E.), 4 Tiere 10 V. E. Tonephin. Die Blutdruckerhöhung war bei den Tieren Nr. 3 und 6 gering, bei den übrigen Tieren deutlich. Bei den Tieren Nr. 7 und 8 wurde eine Scheinoperation ausgeführt, die Nebennieren wurden auspräpariert, jedoch in Situ gelassen um den eventuellen Einfluß des operativen Eingriffs selbst auf den Blutdruck beobachten zu können. In der zweiten Gruppe (Tabelle 2) habe ich die adrenalektomierten Tiere zusammengefaßt. Darunter befinden sich zu Beginn des Versuchs naturgemäß mehrere sehr niedrige Blutdruckwerte (Tiere Nr. 3, 4, 6 und 7). Nach Tonephingaben stieg der Blutdruck nur um wenig an.

Tabelle 1 Tiere mit Nebennieren.

Tier Nr.	Tonephingabe in V. E.	Blutdruck zu Beginn des Versuches in mm Hg	Höchster Blutdruckwert in mm Hg	Änderung
1	5	70	175	+ 105
2	5	75	170	+ 95
3	5	80	125	+ 45
4	5	105	185	+ 85
5	10	100	185	+ 85
6	10	140	210	+ 75
7	10	88	210	+ 122
8	10	90	200	+ 110

Tabelle 2. Epinephrektomierte Tiere.

Tier Nr.	Tonephingabe in V. E.	Blutdruck zu Beginn des Versuches in mm Hg	Höchster Blutdruckwert in mm Hg	Änderung
1	5	75	104	+ 29
2	5	80	120	+ 40
3	5	50	60	+ 10
4	10	35	Keine Änderung	
5	5	65	75	+ 10
6	5	30	45	+ 15
7	5	50	75	+ 25
8	10	90	140	+ 50
9	10	65	85	+ 20
10	10	60	85	+ 25
11	10	85	95	+ 10
12	10	65	80	+ 15

Auf Grund meiner Versuche kann festgestellt werden, daß nach der Entfernung der Nebennieren der Anstieg des Blutdrucks bedeutend weniger deutlich ist als bei gesunden Tieren. Bei normalen Katzen machte der Anstieg des Blutdrucks im allgemeinen 76 mm Hg aus, bei adrenalektomierten Tieren dagegen nur 21 mm Hg. Auf Grund meiner Befunde ist also die Annahme gerechtfertigt, daß das Vasopressin die Blutdrucksteigerung — wenigstens zum Teil — im Wege der Nebennieren erzeugt. Die Epinephrektomie ist allerdings ein schwerer Eingriff und es kann angenommen werden, daß eventuell wegen des schweren Allgemeinzustandes der Tiere kein so hoher Anstieg des Blutdrucks erfolgt wie bei normalen Tieren. Zwei Tatsachen sprechen jedoch gegen eine solche Annahme. Einerseits erhielten wir bei den adrenalektomierten Tieren auch in jenen Fällen, in welchen der Blutdruck auf Tonephin nur sehr wenig angestiegen ist, mit anderen pressorischen Stoffen, wie z. B. Adrenalin, Sympatol, Veritol, einen ebenso hohen Blutdruckanstieg wie bei normalen Tieren. Andrerseits wurde bei zwei Tieren (Tabelle 1, Nr. 7 und 8) zur Entscheidung der Frage, wie weit die Operation an und für sich die blutdrucksteigernde Wirkung des Vasopressins beeinflußt, nur eine Scheinoperation ausgeführt. Wie die Tabelle zeigt, ist die Blutdruckerhöhung bei diesen Tieren ebenso zustande gekommen wie bei den nichtoperierten Tieren. Es ist demnach nicht wahrscheinlich, daß die durch die Operation verursachte Verschlechterung des allgemeinen Zustandes die Abnahme der blutdrucksteigernden Wirkung des Vasopressins verursacht hätte. Viel wahrscheinlicher ist jene Annahme, daß die Verminderung der blutdrucksteigernden Wirkung unmittelbar mit dem Fehlen der Nebennieren zusammenhängt. Gegen die Rolle der Nebennieren könnte jedoch die bereits erwähnte Beobachtung Elliots sprechen, daß der Adrenalingehalt der Nebennieren unter dem Einfluß der pressorischen Substanz des HHL-Hormons nicht abnimmt. Beachten wir indes die Angaben von Nikolaeff (14), nach welchen unter der Wirkung von

HHL-Extrakten nicht Adrenalin, sondern sonstige pressorische Amine frei gemacht werden, so verliert dieses Argument viel an Beweiskraft. Nicht außer acht zu lassen ist jedoch, daß wir bei adrenalektomierten Tieren dennoch eine — wenn auch wesentlich geringere — Blutdrucksteigerung erhalten haben. Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß der pressorische Stoff des HHL seine Wirkung nicht ausschließlich im Wege der Nebennieren ausübt. Mit den oben erwähnten Versuchsergebnissen anderer Forscher übereinstimmend weist dies darauf hin, daß das Vasopressin auch unmittelbar auf die Muskulatur der Gefäße wirkt.

Literatur.

1) Oliver u. Schäfer: J. Physiol. (Brit.) **18**, 277 (1895). — 2) Howell: J. exper. Med. (Am.) **3**, 245 (1898). — 3) Trendelenburg: Die Hormone 1929. — 4) Geiling-Herrick-Essex: Amer. J. Physiol. **109**, 27 (1934). — 5) Brouha u. Simonnet: C. r. Soc. Biol. Paris **97**, 233 (1927). — 6) Leimdörfer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **118**, 253 (1926). — 7) Heller u. Kusunoki: Ebenda **173**. 301 (1933). — 8) Spiegel u. Inaba: Z. exper. Med. **63**, 505, 532 (1938). — 9) Cushing: Papers rel. to the pituitary body, hypothalamus etc. 1932. — 10) Elliot: J. Physiol. (Brit.) **49**, 38 (1914). — 11) Elliot: Ebenda **44**, 374 (1912). — 12) Börner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **79**, 218 (1916). — 13) Rein-Schneider: Klin. Wschr. 870 (1934). — 14) Nikolaeff: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **140**, 225 1929).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.
(Direktor: Prof. Dr. E. Keeser.)

Zur Wirkungsweise seltener Erden.

Von

H.-A. Oelkers.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Januar 1940.)

I.

Bei früheren Untersuchungen[1] über die blutgerinnungshemmende Wirkung seltener Erden war gemeinsam mit Vincke gefunden worden, daß die Chloride der Erden Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym die Blutgerinnungszeit nur bei intravenöser Injektion verlängern. Da die zu einer stärkeren und nachhaltigen Wirkung auf die Blutgerinnung erforderlichen Dosen verhältnismäßig hoch sind (30—50 mg pro kg Körpergewicht) schien es denkbar, daß die — insbesondere bei rascher Injektion oder bei Verwendung konzentrierterer Lösungen — auftretenden toxischen Nebenwirkungen mit einer eißweißfällenden Wirkung der genannten Verbindungen zusammenhängen könnten.

Die eiweißfällende Wirkung von Salzen seltener Erden ist nicht sehr stark. Die Autoren[2], die sich mit dieser Frage beschäftigten, geben an, daß diese Verbindungen Eiweiß nur in gewissen mittleren Konzentrationen ausfällen. Nach Ajazzi-Mancini[3] sind die Niederschläge reversibel und werden sowohl durch einen Überschuß von Salz wie von Eiweiß gelöst.

Diese Angaben ließen sich bei eigenen Versuchen bestätigen. Darüber hinaus aber zeigte es sich, daß die eiweißfällende Wirkung der Chloride von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym auch von der Reaktion der Versuchslösungen abhängig ist und nur in einem ziemlich engen p_H-Bereich erfolgt.

Bei tropfenweisem Zusatz einer 1- oder 2%igen Lösung von z. B. Neodymchlorid (p_H = etwa 4,6) zu frischem Kaninchenserum finden sich die ersten Zeichen einer Eiweißausfällung (Trübung, die beim Umrühren nicht mehr verschwindet), wenn der p_H im Versuchsansatz etwa 6,5—6,6 beträgt. Zur Zeit des Maximums der Fällung beträgt der p_H = 6,3—6,4. Fährt man mit der Zugabe der betreffenden Neodymlösung fort, so beginnt die Auflösung des Eiweißniederschlages, wenn der p_H des Gemisches etwa 5,9—6,0 beträgt. Die anderen oben genannten Salze verhalten sich ähnlich.

[1] Vincke, E., u. H.-A. Oelkers: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **187**, 594 (1937). — [2] Vgl. bei Steidle, H.: Handb. d. exper. Pharmak. III, **4**, 2189 (1935). — [3] Ajazzi-Mancini, M.: Arch. di Fisiol. **25**, 257 (1927).

Hierbei ist zu erwähnen, daß die Stärke der Eiweißausfällung bei den verschiedenen Seren mitunter verschieden stark ist, ein Befund, der wahrscheinlich mit dem wechselnden Albumin- und Globulingehalt der einzelnen Sera zusammenhängt.

Die ausschlaggebende Rolle der Wasserstoffionenkonzentration für die eiweißfällende Wirkung von Salzen des Lanthans, Cers, Praseodyms, Lanthandidyms und Neodyms zeigten Versuche, bei denen die 1—6%igen Lösungen der Chloride dieser Erden durch Zugabe genügender Mengen eines geeigneten Puffers, z. B. von Natriumacetat, neutralisiert worden waren. Der Zusatz beliebiger Mengen derartiger Lösungen zu frischem Serum ruft keine Eiweißausfällung mehr hervor.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde frisches Kaninchenserum durch Zugabe einiger Tropfen 0,1 n Salzsäure auf p_H = etwa 5,8 gebracht. Hierdurch ließ sich ebenfalls eine Ausfällung des Serumeiweißes durch die Chloride der genannten seltenen Erden verhindern.

Bei allen diesen Versuchen fiel jedoch auf, daß sich auch nach dem Zusatz kleinerer Mengen von Salzen seltener Erden zum Serum stets nach einiger Zeit eine schwache Opaleszenz auszubilden pflegt. Die Natur dieser geringgradigen Trübung, die vielleicht auf einer teilweisen Ausfällung der Bicarbonationen des Plasmas beruht, ließ sich nicht feststellen. Da diese Trübung bei manchen Seren deutlicher ist als bei anderen, läßt sich die Möglichkeit nicht von der Hand weisen, daß sie z. T. mit der Flockung eines Eiweißkörpers in Zusammenhang stehen könnte.

Ähnliche Ergebnisse wie bei den Versuchen mit dem Zusatz der sauren oder schwach alkalischen 1—2%igen Lösungen der genannten Salze zu Serum wurden bei entsprechenden Versuchen mit frischem Plasma erhalten. Doch ist hier die Opaleszenz, die sich einige Zeit nach der Zugabe der Salze zum Plasma entwickelt, etwas stärker.

Nimmt man an, daß diese geringgradigen Trübungen z. T. auf einer Eiweißflockung beruhen, so könnte der Befund vielleicht zur Erklärung der blutgerinnungshemmenden Wirkung seltener Erden mit herangezogen werden. Man könnte hierbei z. B. an eine teilweise Ausfällung des Fibrinogens oder auch anderer Eiweißkörper des Blutes denken. So soll nach den Untersuchungen von Ferranti und Torrini[4] bei geeigneten Fällungsbedingungen eine Adsorption der Gerinnungsfaktoren an Euglobulinniederschläge eintreten. Nach diesen Autoren besitzt ferner eine Unterfraktion der Euglobuline, deren isoelektrischer Punkt im schwachsauren Bereich liegt, die Funktion einer Thrombokinase. Durch die mehr oder minder vollständige Ausfällung dieses Eiweißkörpers wäre mithin eine Hemmung des Blutgerinnungsvorganges möglich. Sicherlich spielen aber noch andere Vorgänge dabei eine Rolle. So fiel bei der Bestimmung der Thrombocytenzahl immer wieder auf, daß es nach der intravenösen In-

[4] Ferranti, F., u. A. Torrini: Boll. Ist. sieroter. milan. **17**, 642 (1938).

jektion von Dosen der genannten Salze, die die Blutgerinnungszeit stärker erhöhen, zu einer teilweisen Agglutination der Blutplättchen kommt, so daß die Auszählung erschwert und gelegentlich sogar unmöglich wird (vgl. auch C. Jenckel[5] und Oelkers und Vincke[6]). Diese Wirkung scheint nach den bisherigen Erfahrungen etwa ebensolange anzuhalten, wie die hemmende Wirkung auf die Blutgerinnung. Trotzdem scheint es nicht möglich, die Blutgerinnungshemmung allein als Folge einer Thrombocytenagglutination anzusehen, da die Stärke beider Erscheinungen häufig nicht miteinander parallel geht.

Versuche mit intravenöser Injektion von mit Acetat neutralisierten Lösungen der Chloride der obengenannten seltenen Erden an Kaninchen und Katzen ergaben erwartungsgemäß, daß derartige Lösungen in annähernd gleich starker Weise die Blutgerinnung hemmen wie nicht neutralisierte. Eigenartigerweise trat aber bei diesen Versuchen der schon früher beschriebene Befund, wonach das Maximum der Gerinnungshemmung erst einige Zeit nach der intravenösen Injektion auftritt, bei diesen Versuchen besonders deutlich in Erscheinung.

Die Tabelle 1 gibt einige Versuche mit Neodymchloridlösungen wieder, deren p_H durch Zusatz von Natriumacetat etwa 6,9 betrug. Die 2,4—2,8 kg schweren Kaninchen erhielten die 1% Neodymchlorid ($NdCl_3 \cdot 6\,H_2O$) enthaltenden Lösungen intravenös. Die Injektionsdauer betrug stets genau $1^1/_2$ Minuten. Die erste Blutentnahme (an dem nicht zur Injektion benutzten Ohr des betreffenden Tieres) erfolgte stets 1 Minute nach Beendigung der Injektion. Die Bestimmung der Blutgerinnungszeit erfolgte nach dem Verfahren von Riesser und Nagel[7].

Die Tabelle 2 zeigt Parallelversuche mit einer nicht gepufferten [d. h. also schwach sauren (p_H = etwa 4,5)] 1%igen Lösung von Neodymchlorid.

Der Vergleich der beiden Tabellen zeigt, daß die Blutgerinnungszeit nach der intravenösen Injektion der mit Acetat gepufferten Neodym-

Tabelle 1. $NdCl^3 \cdot 6\,H_2O$.

Kaninchen Nr.	mg Salz pro kg Körpergewicht	Gerinnungszeit bei 25° in Minuten nach								
		0	1	3	5	8	10	20	30	60 Min.
1	30	4	4	5	5	—	7	9	12	15
2	30	3	3	$4^1/_2$	8	—	13	16	24	
3	30	2	2	$2^1/_2$	—	$5^1/_2$	$6^1/_2$	—	18	23
4	30	$3^1/_2$	4	5	9	—	13	—	17	19
5	30	4	$4^1/_2$	—	6	10	—	19	22	24
6	30	$3^1/_2$	$3^1/_2$	$4^1/_2$	—	$7^1/_2$	—	12	16	27
7	50	$2^1/_2$	—	$8^1/_2$	—	19	—	26	38	45
8	50	$2^1/_2$	$3^1/_2$	—	17	—	36	—	60	60
9	50	3	$4^1/_2$	9	21	—	38	36	40	60
10	50	$4^1/_2$	7	11	30	—	45	44	55	60

[5] Jenckel, C.: Dissertation Hamburg 1937. — [6] Oelkers, H.-A., u. E. Vincke: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 53 (1938). — [7] Riesser, O., u. A. Nagel: Ebenda **179**, 743 (1935).

Tabelle 2.

Kaninchen Nr.	mg Salz pro kg Körpergewicht	Gerinnungszeit bei 25° in Minuten nach								
		0	1	3	5	8	10	20	30	60 Min.
1	30	$4^1/_2$	6	—	11	$14^1/_2$	16	18	21	17
2	30	$3^1/_2$	$4^1/_2$	8	10	—	14	17	17	18
3	30	$2^1/_2$	3	6	$13^1/_2$	—	15	$20^1/_2$	21	19
4	30	4	5	8	9	—	19	28	—	60
5	30	2	3	5	—	17	21	21	29	30
6	50	$2^1/_2$	4	11	19	—	27	60	60	60
7	50	4	5	17	23	—	21	41	60	60
8	50	$3^1/_2$	6	—	27	—	37	60	60	60

chloridlösungen etwas langsamer ansteigt als nach Injektion der reinen Neodymchloridlösungen. Dies geht besonders deutlich aus den Versuchen mit Injektion von 30 mg Neodymchlorid pro kg Körpergewicht hervor. Nach der Injektion höherer Dosen, die an sich schneller auf die Gerinnungszeit einwirken, ist der Unterschied zwischen neutral und sauer reagierenden Lösungen der Salze seltener Erden weniger ausgesprochen.

Ein Unterschied zwischen der längere Zeit nach der Injektion schließlich erreichten maximalen Hemmung der Blutgerinnung besteht dagegen nicht. Auch die Dauer der gerinnungshemmenden Wirkung ist bei Verwendung gepufferter und ungepufferter Lösungen der genannten Salze seltener Erden anscheinend gleich. Indessen ist es schwer, genaue Angaben hierüber zu machen, da die einzelnen Tiere recht verschieden stark auf gleiche Gaben derselben Verbindung reagieren können. Man muß ferner für derartige Versuche Tiere möglichst gleichen Gewichtes benutzen. Die intravenöse Injektion einer bestimmten Dosis eines der genannten Salze pro kg Gewicht wirkt bei schweren Tieren anscheinend etwas stärker als bei leichten.

Diese Beobachtung erscheint im Hinblick auf die von Dyckerhoff und Goossens[8] empfohlene Verwendung von Neodymacetat („Auer 144") zur Thromboseprophylaxe bei Menschen wichtig. Trotzdem muß es aber nach den bisher vorliegenden Untersuchungen als unwahrscheinlich bezeichnet werden, daß die von diesen Autoren empfohlenen täglichen intravenösen Injektionen von 250 bis maximal 500 mg (entsprechend 4—8 mg pro kg Körpergewicht) Neodymacetat beim Menschen die Blutgerinnungszeit 24 Stunden lang wesentlich erhöhen können. Nach den von diesen Autoren wiedergegebenen Versuchsprotokollen führen derartige Dosen beim Menschen $1^1/_2$—2 Stunden nach der Injektion bestenfalls zu einer Verdoppelung der normalen Blutgerinnungszeit. Es kann daher nach den Erfahrungen zahlreicher Tierversuche kaum ein Zweifel darüber bestehen, daß diese Wirkung, die bei Kaninchen durch intravenöse Injektion von etwa 12—15 mg Neodymchlorid pro kg Körpergewicht erzielt wird, nach weiteren 1—2 Stunden wieder verschwunden ist. Zur Erzielung

[8] Dyckerhoff, H., u. N. Goossens: Z. exper. Med. **106**, 181 (1939).

einer etwa 24 Stunden anhaltenden merklichen Verlängerung der Blutgerinnungszeit sind bei Kaninchen ganz wesentlich höhere Dosen (mindestens 100—120 mg pro kg) Neodymchlorid, die aber bereits sehr unangenehme Nebenwirkungen (Kreislaufschädigungen, unstillbare Blutungen) haben können, erforderlich.

Wie früher berichtet[1], wurde im Gegensatz zu den Befunden am lebenden Tier bei Versuchen in vitro gefunden, daß eine deutliche Hemmung der Blutgerinnung hier erst durch verhältnismäßig sehr hohe Konzentrationen von Salzen seltener Erden zu erreichen ist. Bei neuen Versuchen, zu denen bei sonst gleicher Technik diesmal die mit Natriumacetat gepufferten Lösungen von Neodym- und Praseodymchlorid benutzt wurden, ließen sich die damaligen Ergebnisse bestätigen: Eine deutliche Hemmung der Blutgerinnung tritt in vitro erst bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen — oberhalb 100–150 mg% der genannten Salze — ein, während in vivo bereits viel kleinere Mengen (von etwa 40 mg% an) die Blutgerinnungszeit stark erhöhen. Dies trifft außer für Kaninchenblut auch für das Blut von Katzen und Hunden zu.

Dieser Befund steht in völligem Gegensatz zu dem Verhalten anderer blutgerinnungshemmender Mittel, wie z. B. Heparin, Hirudin und Natriumthiosulfat, die in vitro stark, in vivo dagegen merklich schlechter oder z. T. gar nicht auf die Blutgerinnungszeit einwirken. Vom Natriumthiosulfat genügen z. B. 2.5 ccm einer n/1 Lösung, um 50 ccm Kaninchenblut für längere Zeit ungerinnbar zu machen, während die intravenöse Verabfolgung auch verhältnismäßig sehr viel höherer Gaben keine Verlängerung, sondern im Gegenteil eine leichte Verkürzung der Blutgerinnungszeit bewirkt.

Auf Grund der Tierversuche ist anzunehmen, daß der Unterschied zwischen den Befunden in vivo und in vitro damit zusammenhängt, daß es sich bei der Wirkung seltener Erden auf die Blutgerinnung um eine Reaktion handelt, zu deren Ausbildung eine gewisse Zeit erforderlich ist. Bei dem raschen Ablauf des normalen Gerinnungsvorganges, insbesondere von Kaninchenblut (2–4 Minuten), vermag daher die Hemmungswirkung seltener Erden sich in vitro bei Verwendung kleinerer Dosen nicht genügend schnell geltend zu machen.

Mit zunehmender Konzentration an Salzen seltener Erden tritt aber eine Beschleunigung der Reaktion ein. So ruft die intravenöse Injektion von 60–100 mg $NdCl_3$ pro kg Körpergewicht, d. h. also etwa 100–200 mg auf 100 ccm Blut, fast augenblicklich eine hochgradige Hemmung der Blutgerinnung hervor. Es wird daher verständlich, daß diese Konzentrationen von Neodymchlorid auch in vitro die Blutgerinnung hemmen oder ganz aufheben.

Niedrigere Konzentrationen wirken jedoch — wie erwähnt — erst nach einer Latenzzeit gerinnungshemmend. Dies ließ sich auch bei Versuchen in vitro zeigen. Hierfür war es erforderlich, statt mit Blut mit

Oxalatplasma zu arbeiten. Nach dem von Dyckerhoff und Mitarbeitern [9] angegebenen Verfahren wurden 9 Teile Blut (Hund) mit 1 Teil 2%iger Ammoniumoxalatlösung vermischt und die Blutkörperchen abzentrifugiert. Unmittelbar vor dem Versuch wurde dann 1 Teil Plasma mit 3 Teilen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Es wurden dann je 3 ccm des verdünnten Plasmas in Meßgläschen gefüllt, und diese in eine dem Vorschlag von Fischer [10] entsprechende Apparatur gebracht. Sodann wurden je 1,0 ccm der zu prüfenden Lösung und zu verschiedener Zeit danach 0,5 ccm einer 1%igen Calciumchloridlösung zugesetzt.

Wurde das Calciumchlorid bereits eine Minute nach der Neodymzugabe dem Ansatz zugesetzt, so trat bei einer Neodymkonzentration von 3,3 mg% im Ansatz eine eben erkennbare Verlängerung der Gerinnungszeit ein. Betrug das Intervall zwischen Neodymchlorid- und Calciumzugabe längere Zeit, so war die Verzögerung der Gerinnung erheblich stärker und auch geringere Neodymchloridkonzentrationen verlängerten den Gerinnungsvorgang deutlich.

Tabelle 3.

Ansatz	Konzentration an $NdCl_3 \cdot 6H_2O$ in mg%	Zeit bis zur Zugabe von $CaCl_2$ in Min.	Gerinnungszeit in Minuten		
			Phase I	Phase II	Phase III
I	0	1	$2^1/_4$	$2^1/_2$	$2^1/_2$
II	11	1	$2^1/_2$	$3^1/_2$	8
III	3,3	1	$2^1/_4$	3	4
IV	1,1	1	$2^1/_4$	$2^1/_2$	$2^1/_2$
V	11	5	3	$5^1/_2$	14
VI	3,3	5	$2^1/_2$	$3^1/_2$	$5^1/_2$
VII	1,1	5	$2^1/_4$	3	$3^1/_2$
VIII	11	30	5	25	60
IX	3,3	30	$3^1/_2$	6	9
X	1,1	30	$2^1/_2$	$3^1/_2$	5

Die Tabelle 3 gibt einen derartigen Versuch wieder. Die für die Gerinnungszeit angeführten Zahlen sind der Mittelwert aus zwei Parallelbestimmungen. Es erwies sich hierbei als zweckmäßig, den Gerinnungsvorgang in drei Phasen einzuteilen. Ähnlich wie dies Dyckerhoff, Behm, Goossens und Miehle beschrieben haben, tritt bei der beschriebenen Versuchsanordnung als erstes Zeichen beginnender Gerinnung eine plötzlich einsetzende Entmischung des nach der Calciumzugabe trüb gewordenen Plasmas in Form feiner Flöckchen auf (Phase I). Mit dem Fortschreiten der Gerinnung bilden sich größere Koagula, und zwar oft in Form von Fäden und Klümpchen (Phase II), die sich schließlich zusammenballen und absetzen (Phase III). Eine völlige Erstarrung des Ansatzes findet nicht

[9] Dyckerhoff, H., W. v. Behm, N. Goossens u. H. Miehler: Biochem. Z. **288**, 271 (1936). [10] Fischer, A.: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **225**, 737 (1930).

statt. Diese Einteilung in drei Phasen erwies sich als zweckmäßig, da die geprüften Salze seltener Erden in niedrigeren Konzentrationen den Eintritt des Gerinnungsbeginnes nur unerheblich, das Fortschreiten des Gerinnungsvorganges dagegen deutlich verzögern (vgl. Tabelle 3). Sie stehen auch in dieser Beziehung in Gegensatz zu anderen gerinnungshemmenden Mitteln.

II.

Die Untersuchung seltener Erden auf isolierte Organe bietet Schwierigkeiten, da seltene Erden mit Phosphat- und Bicarbonationen unlösliche Salze bilden. Höber und Spaeth[11] erwähnten in ihrer Mitteilung über den Einfluß seltener Erden auf die Kontraktilität des Muskels zwar bereits 1914, daß seltene Erden in bicarbonathaltiger Ringerlösung ausfallen, doch wurde diesem Umstand von den verschiedenen Untersuchern anscheinend keine Beachtung geschenkt. In den Mitteilungen (vgl. z. B. die zusammenfassende Darstellung bei Steidle[12]) über die Wirkung seltener Erden auf Herz- und Gefäßpräparate, auf den isolierten Darm u. dgl. wird nicht einmal erwähnt, daß bei Zusatz wasserlöslicher Salze von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym und Thor zu den üblichen Bicarbonat und z. T. auch Phosphat enthaltenden Ringer- oder Tyrodelösungen sogleich Fällungen auftreten. Da hierbei die Reaktion der betreffenden Nährlösung nach der sauren Seite verschoben wird, so ist anzunehmen, daß die von den einzelnen Autoren an isolierten Organen erhobenen Befunde sicher nicht allein durch die untersuchten seltenen Erden, sondern auch – und vielleicht vielfach sogar ausschließlich — durch die Veränderung der Reaktion der verwandten Nährlösung hervorgerufen wurden. So wird verständlich, daß z. B. Mines[13] angibt, daß die von ihm geprüften Salze des Lanthans, Yttriums und Cers ähnlich wie Säuren auf das isolierte Froschherz wirken.

Wie oben geschildert, wirken die bisher daraufhin geprüften Salze seltener Erden bei schwach sauerer Raktion (etwa $p_H = 6{,}6—6{,}1$) eiweißfällend. Setzt man daher zu einer der üblichen Nährlösungen, in der sich isolierte Organe befinden, Chloride seltener Erden im Überschuß zu, so wird nach Ausfällung der vorhandenen Bicarbonat- und Phosphationen (der plötzliche Entzug dieser Ionen dürfte ebenfalls Funktionsänderungen isolierter Organe hervorbringen können) die Reaktion der Lösung schwach sauer werden und damit auch die eiweißfällende Wirkung der betreffenden seltenen Erde zur Geltung kommen.

Aus allen diesen Gründen erscheint es notwendig, Versuche über die Wirkung seltener Erden auf isolierte Organe in Nährlösungen vorzunehmen, die als Puffer Salze enthalten, die mit seltenen Erden keine Fällungen

[11] Höber, R., u. R. J. Spaeth: Pflügers Arch. **159**, 433 (1914). — [12] Steidle, H.: Handb. exper. Pharmak. III, **4**, 2189 (1935). — [13] Mines, G. R.: J. Physiol. (Brit.) **42**, 327 (1910); **42**, 309 (1911).

ergeben und gleichzeitig nicht etwa schädigend auf die betreffenden isolierten Organe wirken.

Bei Versuchen, die am nach Straub isolierten Froschherzen, am Froschgefäßpräparat nach Laewen-Trendelenburg und am isolierten Kaninchenohr nach Krawkow-Pissemski vorgenommen wurden, führte der Ersatz des Bicarbonats und Phosphats in der üblichen Tyrodelösung [14] durch geeignete Natriumborat-Salzsäuremischungen, die keine Fällungen mit seltenen Erden bewirken, zu befriedigenden Ergebnissen. Am isolierten Kaninchendünndarm wirkten jedoch die gleichen Puffermischungen ausgesprochen schädigend.

Als wesentlich günstiger erwies sich Natriumacetat, das, wie bereits erwähnt, ebenfalls keine Fällung mit den Chloriden seltener Erden gibt. Setzt man z. B. 5—10 ccm einer 30%igen Natriumacetatlösung zu 1000,0 ccm einer ohne Phosphat- und Bicarbonatzusatz hergestellten Tyrodelösung zu, so beträgt der $p_H = 6{,}6$ bzw. 6,8. Bei Speisung mit einer derartigen Nährlösung arbeitet sowohl das isolierte Froschherz (nach Straub) als auch das isolierte Meerschweinchenherz (nach Langendorff) anscheinend völlig normal. Versuche am isolierten Kaninchendarm hatten ebenfalls ein gutes Ergebnis.

Natriumacetat erscheint daher in bestimmten Fällen als Ersatz für Natriumbicarbonat in Nährlösungen geeignet.

Die Zahl der Untersuchungen über die Wirkung seltener Erden auf glattmuskelige Organe ist, wie aus der zusammenfassenden Darstellung von Steidle [12] hervorgeht, gering. Der Wert dieser Untersuchungen muß außerdem nach dem oben Gesagten bezweifelt werden. Es erschien daher interessant, Versuche über den Einfluß der Chloride von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym auf den isolierten Kaninchendarm vorzunehmen.

Die Untersuchungen erfolgten in der üblichen Versuchsanordnung. Die für die Versuche benutzte Nährlösung enthielt 8,6 g NaCl, 0,24 g $CaCl_2$, 0,22 g KCl und 1 g Traubenzucker pro Liter. Hierzu wurden dann 10 ccm einer 30%igen Natriumacetatlösung und 2—3 Tropfen einer 0,1 n Natronlauge hinzugegeben. Da der Darm in dieser Flüssigkeit annähernd ebenso kräftig und regelmäßig zu arbeiten pflegt wie in bicarbonathaltiger Tyrodelösung, dürfte die Ansicht von Mansfeld [15] sowie von Rona und Neukirch [16], die dem Karbonation die Bedeutung des die Automatie unterhaltenden Reizes bei der Darmmuskulatur zuschreiben, unzutreffend sein.

Die Versuche ergaben dann, daß der Zusatz der Chloride von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym, Neodym oder Thor zur Badeflüssigkeit in Form 1%iger, mit Natriumacetatzusatz annähernd neutralisierter Lösungen in kleineren Mengen wirkungslos bleibt, in etwas größeren

[14] Tyrode: Arch. internat. Pharmacodynam. **20**, 205 (1910). — [15] Mansfeld, G.: Arch. ges. Physiol. **188**, 247 (1921). — [16] Rona, P., u. P. Neukirch: Ebenda **148**, 273 (1912).

eine Tonusabnahme und Abschwächung der Pendelbewegungen bewirkt. Die kleinste Konzentration, bei der diese Wirkung auftritt, beträgt bei allen Salzen 6—8 mg%. Bei einer Konzentration von 10 mg% ist die Wirkung bereits sehr deutlich.

Thorchlorid unterscheidet sich allerdings von den anderen geprüften Salzen durch eine größere Giftigkeit. Bereits Konzentrationen von 7—8 mg% führen unter starker Tonusabnahme rasch zum Aufhören der Kontraktionen des Darmes. Diese Wirkung ist fast immer irreversibel, während die darmlähmende Wirkung auch wesentlich höherer Konzentrationen der anderen Salze leicht auswaschbar ist.

Dieser Unterschied dürfte damit zusammenhängen, daß Thorchlorid ein ausgesprochenes Eiweißfällungsmittel ist und im Gegensatz zu den Chloriden der anderen daraufhin geprüften seltenen Erden auch in neutraler Lösung noch deutlich Eiweiß fällt.

Weitere Versuche zeigten dann, daß höhere Konzentrationen (15 bis 20 mg%) der Chloride von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym zunächst zu einer starken Tonussenkung und zum allmählichen Verschwinden der Darmkontraktionen führen. Gleichzeitig mit dem Aufhören der Pendelbewegungen oder kurz vorher steigt dann der Darmtonus langsam wieder an, und zwar meist weit über die Norm hinaus. Auch diese Wirkung, an der übrigens ein weiterer Zusatz des betreffenden Salzes nichts mehr ändert, ist gut auswaschbar. Nach dem Ersatz der Nährlösung durch frische stellen sich Tonus und Darmbewegungen rasch in der alten Stärke wieder her.

In weiteren Versuchen ließ sich zeigen, daß die Tonussenkung und die Peristaltikhemmung, die durch Konzentrationen von 10—15 mg% der genannten Salze (bis auf Thorchlorid) bewirkt wird, sich durch Pilocarpin (0,003—0,004 mg%) und ebenso durch Acetylcholin (0,003 mg%) beheben läßt. Bariumchlorid wirkt dagegen verhältnismäßig schlecht. Konzentrationen von 2—3 mg% in der Nährlösung, die normalerweise einen starken Tonusanstieg bewirken, hatten auf den durch die verschiedenen seltenen Erden gelähmten Darm keine oder doch nur eine recht geringe Wirkung.

Versuche, den Tonusanstieg, der, wie erwähnt, bei höheren Konzentrationen seltener Erden eintritt, durch Atropin oder durch Adrenalin zu beseitigen oder auch nur zu hemmen, hatten ein negatives Ergebnis. Während Konzentrationen von 0,1 mg% dieser Verbindungen auf den normalen Darm bereits eine kräftige Wirkung auszuüben pflegen, bleiben selbst 10fach höhere Konzentrationen auf den durch seltene Erden kontrahierten Darm ohne Einfluß. Dagegen gelang es durch Papaverin und durch Sestron die Kontraktur zu lösen. Allerdings waren von beiden Verbindungen 2—3fach höhere Konzentrationen erforderlich, als die, die normalerweise eine Senkung des Darmtonus herbeiführten.

Die Abb. 1 gibt einen dieser Versuche wieder.

Bei diesem Versuch wurde bei 1. soviel von einer durch Natriumacetat neutralisierten 1 %igen Neodymchloridlösung der Nährlösung zugesetzt, daß die Konzentration an Neodymchlorid 20 mg% betrug. Als Folge hiervon traten zunächst rasch Tonussenkung und fast gänzliches Aufhören der Darmbewegungen ein. Bald darauf aber nahm der Tonus des Darmstückes rasch und kräftig zu. Auf der Höhe der Kontraktion wurde bei 2. 1 mg Papaverinhydrochlorid pro 100 ccm Flüssigkeit zugegeben, worauf der Tonus wieder absank. Bei 3. wurde „ausgewaschen". Man erkennt, daß daraufhin rasch Tonusanstieg und Wiederkehren der Darmbewegungen erfolgten.

Die Versuche sprechen dafür, daß es sich bei der Wirkung der seltenen Erden auf den isolierten Darm vorwiegend um eine Muskelwirkung handelt.

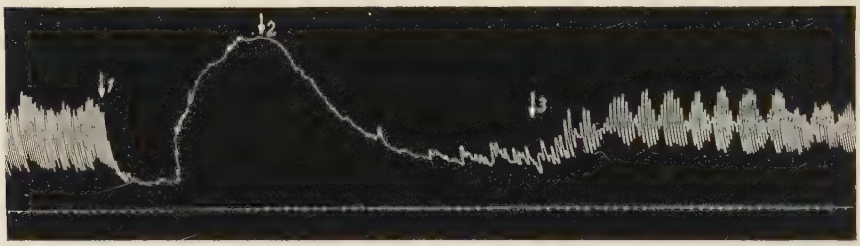


Abb. 1. Isolierter Kaninchendünndarm. Bei 1. Zusatz von Neodymchlorid, bei 2. Zusatz von Papaverinhydrochlorid, bei 3. frische Nährlösung. Zeitmarkierung = 20 Sekunden.

Die geschilderten Wirkungen der untersuchten seltenen Erden treten in vitro erst bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen auf. Es ist daher nicht anzunehmen, daß ähnliche Wirkungen auf den Verdauungstrakt bei der therapeutischen Verabfolgung von Cerverbindungen, die bekanntlich gegen Erbrechen verschiedenster Ätiologie empfohlen werden, eine Rolle spielen. Einige Versuche am Meerschweinchendarm nach Straub und Mitarbeitern [17] zeigten, daß Cerchlorid und ebenso die Chloride von Lanthan, Praseodym, Lanthandidym und Neodym bei peroraler, subcutaner oder intramuskulärer Verabfolgung keinen Einfluß auf Tonus oder Peristaltik ausüben. Auch bei intravenöser Injektion waren kleine Dosen der geprüften Salze in guter Übereinstimmung mit den Versuchen in vitro wirkungslos. Erst die intravenöse Injektion hoher Dosen (40–50 mg pro kg), die bereits eine schwere Schädigung und mitunter den Tod der Tiere verursachten, führte Tonussenkung und Nachlassen oder Aufhören der peristaltischen Darmbewegung herbei.

[17] Straub, W. u. Mitarbeiter: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **169**, 1–34 (1933).

III.

Die 1%igen Lösungen der Chloride der untersuchten seltenen Erden wirken auch bei langsamer intravenöser Injektion von Dosen, die die Blutgerinnungszeit stärker verlängern, blutdrucksenkend. Diese Wirkung hängt wahrscheinlich zum Teil mit der sauren Reaktion der Salze und auch wohl damit zusammen, daß diese in geeigneter Konzentration eiweißfällend zu wirken vermögen. Neutralisiert man die Lösungen der Chloride mit Natriumacetat, so wird die Verträglichkeit besser und es ist möglich, die zu einer erheblichen Verlängerung der Blutgerinnungszeit erforderlichen Dosen (30- 50 mg kg) auch in Form etwas konzentrierterer Lösungen zu verabfolgen, ohne daß eine bedenkliche Kreislaufschädigung entsteht. Immerhin bewirken auch diese Dosen nach Versuchen an Kaninchen, Katzen und Hunden in Urethannarkose bei rascher Injektion oft bereits eine stärkere Herabsetzung des Blutdrucks (A. carotis, Quecksilbermanometer), die sich allerdings meist in wenigen Minuten zurückzubilden pflegt. Höhere Dosen führen stets zu ernsteren Kreislaufstörungen. Da die geprüften Salze am dekapitierten und künstlich beatmeten Tier (Katze) in gleicher Weise oder eher noch etwas stärker blutdrucksenkend wirken wie am nicht dekapitierten, lag es nach den Befunden am isolierten Kaninchendarm nahe, als Erklärung hierfür eine tonussenkende Wirkung auf die Gefäßmuskulatur anzunehmen.

In älteren Untersuchungen an Gefäßpräparaten (vgl. die zusammenfassende Darstellung von H. Steidle [12]) wird allerdings meist angegeben, daß Salze seltener Erden verengend auf die Gefäße wirken; gelegentlich wurden aber auch Gefäßerweiterungen gesehen. Es ist jedoch nach dem oben Gesagten denkbar, daß die von den verschiedenen Autoren an verschiedenen Gefäßpräparaten beobachteten Wirkungen mit der sauren Reaktion und der eiweißfällenden Wirkung der geprüften Salze seltener Erden oder mit ihrer Ausfällung durch Phosphat oder Bicarbonationen (Gefäßverstopfung) zusammenhingen.

Bei eigenen Versuchen, bei denen als Durchströmungsflüssigkeit mit Natriumacetat gepufferte Ringerlösung benutzt wurde, konnte durch niedrige und mittlere Konzentrationen der Chloride von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym weder am Froschgefäßpräparat nach Laewen-Trendelenburg noch am isolierten Kaninchenohr nach Krawkow-Pissemski eine Wirkung auf die Gefäßweite festgestellt werden. Nur bei Durchströmung mit verhältnismäßig hohen Konzentrationen fand sich mäßige Zunahme der Tropfenzahl. Die Tabelle 4 gibt die Versuche mit Neodymchlorid am isolierten Kaninchenohr wieder.

Aus diesen Versuchen geht mithin hervor, daß die geprüften seltenen Erden erst in verhältnismäßig hohen Konzentrationen und auch dann nur schwach peripher gefäßerweiternd wirken. Immerhin ist es möglich, daß andere Gefäßgebiete stärker auf seltene Erden ansprechen. Hierfür

Tabelle 4.

Konzentration an $NdCl_3 \cdot 6H_2O$ in mg%	Tropfenzahl bei Durchströmung mit reiner Acetat-Ringerlösung nach Min.						Tropfenzahl nach dem Umschalten auf Acetat-Ringer + $NdCl_3$ nach Min.							Tropfenzahl nach dem Zurückschalten auf reine Acetat-Ringerlösung nach Min.			
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	25	26	28	30	35
0,1	16	17	16	16	16	16	16	16	17	17	16	16	16	16	16	15	15
0,3	20	21	20	20	20	20	20	20	20	21	21	20	20	20	20	19	18
0,5	21	22	22	22	22	22	22	21	21	21	21	20	20	20	20	20	18
0,8	17	17	18	18	18	17	17	18	18	17	17	18	18	18	18	18	17
1,0	15	14	14	15	15	14	15	15	16	15	15	16	15	15	15	14	13
3,0	19	19	19	18	18	18	18	18	18	18	17	17	18	17	17	17	15
5,0	20	20	20	19	19	19	19	19	20	20	20	20	20	20	20	19	18
8,0	18	18	18	17	18	18	18	17	19	19	19	19	18	18	18	17	17
10,0	18	17	17	18	17	17	18	19	19	19	18	18	18	17	17	16	16
20,0	19	18	19	18	19	19	19	20	21	20	20	19	19	18	18	17	16
50,0	18	18	18	18	18	18	18	18	20	21	21	21	20	20	19	18	17
60,0	16	16	16	15	16	16	16	17	19	20	20	20	20	20	20	18	16
80,0	12	12	11	11	11	11	11	11	13	13	14	14	14	14	14	11	10
100,0	19	20	20	20	20	20	20	19	22	21	22	22	22	22	22	20	20
150,0	20	19	20	19	19	19	19	20	22	22	23	23	22	22	21	19	19
180,0	18	18	18	18	18	18	18	20	22	23	23	23	23	23	23	20	17

sprechen vielleicht die weiter unten beschriebenen Befunde am isolierten Warmblüterherzen.

Versuche am isolierten Froschherzen (nach Straub) sowie am isolierten Ratten- und Meerschweinchenherzen (nach Langendorff) ergaben, daß die geprüften seltenen Erden bereits in sehr niedrigen Konzentrationen herzschädigend wirken. Auch für diese Versuche wurde die oben erwähnte, mit Natriumacetat gepufferte, phosphat- und bicarbonatfreie Tyrodelösung als Nähr- bzw. Durchströmungsflüssigkeit benutzt. Bei den Versuchen am Froschherzen (Esculenten und Temporarier) fiel eine stark wechselnde Empfindlichkeit gegen die untersuchten Salze auf. Während der Sommermonate genügte meist bereits das Vorhandensein von 0,5—2 γ der verschiedenen Salze pro ccm der Tyrodelösung, um eine deutliche Abnahme der Hubhöhe und schließlich diastolischen Herzstillstand herbeizuführen. Während der Wintermonate waren Konzentrationen von 4—10 γ der Salze zum gleichen Effekt erforderlich.

Gleichmäßiger fielen die Versuche am isolierten Meerschweinchenherzen aus. Bereits Konzentrationen von 0,01—0,02 mg% führten zu einer deutlichen Schädigung. Durchströmung mit 0,05—0,1 mg% bewirkten rasch Herzstillstand in Diastole. Dabei fiel die starke Dilatation des Herzens auf (vgl. Abb. 2). Die gleichzeitige erhebliche Zunahme des Coronardurchflusses (Zunahme der Tropfenzahlen um 50—100 %), die regelmäßig beobachtet wurde, dürfte z. T. mit der starken Erschlaffung des Herzens zusammenhängen.

Ebenso wie am Froschherzen war auch am Meerschweinchenherzen die Wirkung der genannten Konzentrationen der Chloride von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym gut „auswaschbar". Die Wirkung von Thorchlorid war dagegen irreversibel. Von den anderen Erden scheinen Praseodym am giftigsten, Lanthan und Cer am wenigsten giftig zu sein; doch sind die Unterschiede nur gering.

Die geprüften seltenen Erden besitzen demnach eine ausgesprochene Herzgiftigkeit. Auch bei Versuchen am ganzen Tier (Katze, Kaninchen), wo in Urethannarkose Blutdruck und Herztätigkeit (Cardiometer nach Rothberger) registriert wurden, fanden sich nach der intravenösen Injektion (Jugularvene) von 50–70 mg der verschiedenen Salze (in Form der 4–6%igen mit Natriumacetat neutralisierten Lösungen pro kg Körpergewicht) gleichzeitig mit einer starken Blutdrucksenkung am Herzen

Abb. 2. Isoliertes Meerschweinchenherz. Durchströmung mit Acetat-Tyrode. Bei 1. Neodymchlorid 0,05 mg%, bei 2. reine Acetat-Tyrodelösung. Zeitmarkierung = 10 Sekunden.

Frequenzverminderung, Abnahme der Amplitude und starke Dilatation. Kleinere Dosen (30–40 mg pro kg) bewirkten dagegen, wie erwähnt, nur eine mäßige und rasch vorübergehende Senkung des Blutdruckes (auch beim decapitierten Tier); am Herzen blieb jedoch (auch beim vagotomierten Tier) eine Verminderung der Frequenz bei meist gleichzeitiger leichter Zunahme der Amplitude oft für längere Zeit bestehen.

Die kreislaufschädigende Wirkung seltener Erden ist bei den einzelnen Tieren recht verschieden. Kaninchen scheinen nach den bisherigen Erfahrungen besonders resistent zu sein. Durch eingreifendere Operationen nimmt aber die Empfindlichkeit erheblich zu. Eine große Bedeutung hat ferner das verwendete Narkosemittel. Mit Avertin oder mit Pernocton narkotisierte Tiere vertragen nur einen Teil der Dosis, die bei mit Urethan narkotisierten Versuchstieren lediglich eine vorübergehende Blutdrucksenkung hervorruft.

Die Ursache der oft schon nach kleineren intravenösen Gaben seltener Erden zu beobachtende Herabsetzung der Herzfrequenz scheinen Störungen der Reizbildung und der Reizleitung zu sein. Hierfür sprechen einige Versuche, bei denen an Kaninchen in Urethannarkose zu verschiedenen Zeiten nach der intravenösen Injektion seltener Erden Elektrokardio-

gramme hergestellt wurden. Die Abb. 3 gibt einen derartigen Versuch dei einem 3,3 kg schweren Kaninchen wieder, bei dem außerdem der Blutdruck (A. carotis, Quecksilbermanometer) fortlaufend aufgezeichnet wurde.

Das Elektrokardiogramm (Abl. II) zeigte zunächst einen normalen Sinusrhythmus mit einer flach positiven Nachschwankung (Abb. 3a). Das Tier

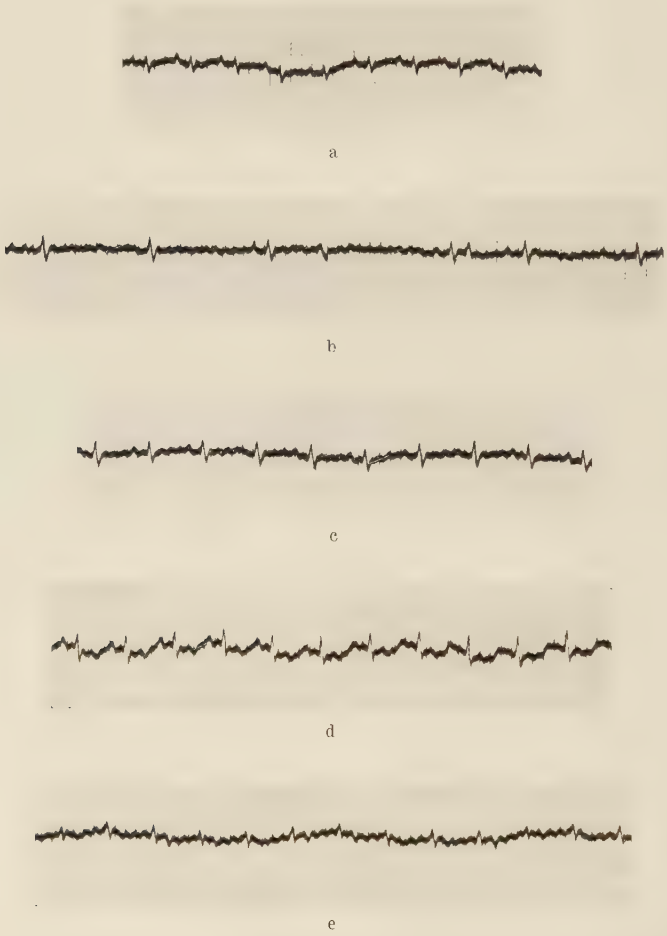


Abb. 3.

erhielt dann 2 ccm einer 9%igen mit Natriumacetat neutralisierten Lösung von Neodymchlorid langsam intravenös (Jugularvene), worauf der Blutdruck rasch von 88 auf 15 mm Quecksilber absank. Genau $^1/_2$ Minute nach der Injektion wurde ein weiteres Elektrokardiogramm hergestellt, das Vorhofsflimmern mit Arhythmia absoluta zeigte (Abb. 3b). Ein 2 Minuten später bei immer noch niedrigem Blutdruck (15 mm Queck-

silber) aufgenommenes Elektrokardiogramm (Abb. 3c) ergab Vorhofsflattern mit regelmäßiger Kammerschlagfolge bei 4 : 1 Blockierung. Weitere 2 Minuten später begann der Blutdruck bereits wieder zu steigen und betrug zu dieser Zeit 30 mm Quecksilber. Auf dem zu dieser Zeit aufgenommenen Elektrokardiogramm fällt besonders die deutliche Senkung des Zwischenstückes auf (Abb. 3d). Weitere 3 Minuten später betrug der Blutdruck wieder 75 mm Quecksilber; auf dem Elektrokardiogramm ist die Senkung des Zwischenstückes wieder verschwunden (Abb. 3e), doch besteht weiterhin Vorhofsflattern. Dieser Zustand änderte sich im Verlauf der folgenden Stunde nicht. Der Blutdruck aber stieg während dieser Zeit auf 96 mm Quecksilber.

IV.

Von Fischler und Roeckl[18] wurde vor einiger Zeit berichtet, daß die intravenöse Injektion größerer Dosen von Salzen seltener Erden bei Kaninchen zeitlich begrenzte Degenerationszustände in der Leber sowie unter Umständen auch in der Milz bewirken. Bei ähnlichen Untersuchungen gemeinsam mit E. Vincke[19], bei denen allerdings etwas kleinere Dosen (30—50 mg/kg) der Salze, dafür jedoch bis zu 10mal in Abständen von 24—48 Stunden intravenös injiziert worden waren, fanden sich nur in wenigen Fällen in der Leber leichte degenerative Veränderungen, die mit Zerfall und leichter Verfettung von Leberzellen einhergingen.

Die Versuche wurden nun nochmals mit den von Fischler und Roeckl angegebenen Dosen (38 mg Neodymion bzw. 25—30 mg Lanthan als Chlorid pro kg 3mal im Abstand von 3—5 Tagen intravenös) an je 3 Tieren wiederholt. Die Tiere machten nach diesen Dosen etwa 1 Tag lang einen leicht kranken Eindruck; doch war die Freßlust nur wenig vermindert.

Die Tiere wurden 2—3 Tage nach der letzten Injektion getötet und seziert. Hierbei zeigten sich an den inneren Organen makroskopisch keine Veränderungen. Die histologische Untersuchung ergab außer der früher beschriebenen Sternzellenspeicherung in der Leber und der Pulpazellenspeicherung in der Milz nur geringfügige degenerative Veränderungen in der Leber. Wahrscheinlich beruht dieser Unterschied zu den Befunden von Fischler und Roeckl auf einer größeren Empfindlichkeit der von diesen Autoren benutzten Kaninchen. Hiermit dürfte auch zusammenhängen, daß es bei dem zur Verfügung stehenden Tiermaterial nicht gelang, die von Fischler und Roeckl nach den angegebenen Dosen seltener Erden beobachteten starken Blutzuckersenkungen aufzufinden. Dabei wurde die Nachprüfung dieses Befundes an nüchternen Kaninchen vorgenommen, während aus den mitgeteilten Versuchsprotokollen von Fischler und Roeckl hervorzugehen scheint, daß die z. T. sehr erheblichen

[18] Fischler, F., u. K. W. Roeckl: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 4 (1938). — [19] Vincke, E., u. H.-A. Oelkers: Ebenda **188**, 465 (1938).

Blutzuckersenkungen, die in einigen Fällen sogar zu hypoglykämischen Krampfanfällen geführt haben sollen, bei nicht nüchternen Tieren auftraten. Bei den eigenen Versuchen bewegten sich die Werte für den Nüchterblutzucker der Kaninchen 1, 3, 5 oder 24 Stunden nach der intravenösen Injektion von 70 mg Neodymchlorid oder von 80—125 mg Lanthanchlorid pro kg Körpergewicht durchaus innerhalb normaler Grenzen.

Zusammenfassung.

1. Die eiweißfällende Wirkung von Salzen seltener Erden hängt außer von der Konzentration von der Reaktion der Versuchsansätze ab. Nach Zusatz geeigneter Pufferlösungen wirken die Chloride von Lanthan, Cer, Praseodym, Lanthandidym und Neodym nicht mehr eiweißfällend.

2. Seltene Erden wirken erst nach einer Latenzzeit gerinnungshemmend. Durch niedrige Konzentrationen wird der Beginn des Gerinnungsvorganges nur unerheblich, dagegen das Fortschreiten der Gerinnung deutlich verzögert.

3. Die Untersuchung der Wirkung seltener Erden auf isolierte Organe ist nur in bicarbonat- und phosphatfreien, gepufferten Nährlösungen möglich. Bei Versuchen in mit Natriumacetat gepufferten Nährlösungen wirkten die genannten Salze auf den isolierten Kaninchendarm erst in verhältnismäßig hohen Konzentrationen lähmend. Sehr hohe Konzentrationen führen nach kurzer Tonussenkung zu starker Tonuszunahme. Die Wirkung scheint vorwiegend muskulär bedingt zu sein.

4. Am Froschgefäßpräparat und am Gefäßpräparat des isolierten Kaninchenohres wurde gefunden, daß die geprüften Salze erst in hohen Konzentrationen eine geringe Gefäßerweiterung herbeiführen.

5. Bei Versuchen am isolierten Froschherzen sowie am isolierten Ratten- und am isolierten Meerschweinchenherzen bewirkten bereits sehr niedrige Konzentrationen der geprüften Salze diastolischen Herzstillstand.

6. An Katzen und Kaninchen wurde gefunden, daß die zu einer nachhaltigen Erhöhung der Blutgerinnungszeit erforderlichen Gaben der verschiedenen seltenen Erden zu Blutdrucksenkungen führen, die in erster Linie durch eine Schädigung des Herzens bedingt sind.

7. Im Gegensatz zu Literaturangaben konnten nach mehrfacher intravenöser Verabfolgung höherer Dosen von Neodym- oder Lanthanchlorid bei Kaninchen keine ernsteren Leberschädigungen beobachtet werden. Auch Blutzuckersenkungen ließen sich nicht feststellen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster.
(Direktor: Prof. L. Lendle.)

Zur Frage der Entstehung der toxischen Digitaliskumulation.

Von

L. Lendle.

(Eingegangen am 11. Januar 1940.)

Die kumulative Digitalisvergiftung, die früher auf eine chemische Anreicherung des Giftstoffes im Herzen bei wiederholter Verabreichung zurückgeführt wurde, wird heute ziemlich allgemein als Folge von z. T. morphologisch erkennbaren Schädigungen am Herzmuskel aufgefaßt. Bauer und Fromherz[1, 2] haben in einer Reihe von Arbeiten gezeigt, daß nach größeren Einzeldosen von Digitoxin oder bei wiederholter Verabreichung mäßiger Gaben die Versuchskatzen erkrankten und daß in ihrem Herzen sich Blutaustritte, Degenerationserscheinungen am glatten Muskel, teils Nekroseherde, teils auch reaktive Prozesse einstellen. Büchner[3], der diese Herzbefunde genauer studierte, betrachtete sie als wahrscheinlich durch eine partielle Anoxämie infolge Drosselung der Coronardurchblutung nach toxischen Digitalisgaben bedingt. Er schließt aber in seiner eigenen Betrachtung die Möglichkeit nicht aus, daß es sich auch um eine direkte Einwirkung der Glykoside auf die glatte Muskulatur handeln könne. Eine spezifische Lokalisierung dieser meist herdmäßigen Veränderungen in den Papillarmuskelspitzen oder in den Trabekeln oder in der Septumwand nahe dem Reizleitungssystem sprach jedoch besonders für eine ursächliche Beteiligung der Coronardrosselung.

Die Beobachtungen von Bauer und Fromherz sind vielfach bestätigt worden und neuerdings sind von Bauer und Reindell[4, 5, 6] in einigen Untersuchungen mit elektrocardiographischer Methode die begleitenden Funktionsstörungen derartiger Vergiftungszustände nach einmaligen oder wiederholten Digitoxingaben genauer studiert worden. Es ergaben sich dabei auch gewisse Veränderungen der Endschwankung in der Herzstromkurve, die meist als Zeichen von Störungen der Herzdurchblutung aufgefaßt werden.

[1] Bauer, H., u. K. Fromherz: Klin. Wschr. **1933**, S. 973. — [2] Bauer, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 699 (1933); **176**, 65, 74 (1934); Fromherz, K.: Klin. Wschr. **1937**, S. 662; Dtsch. med. Wschr. **1934**, S. 1495. — [3] Büchner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **176**, 59 (1934). — [4] Bauer u. Reindell: Ebenda **190**, 461 (1938). — [5] Bauer u. Reindell: Ebenda **191**, 311 (1939). — [6] Bauer u. Reindell: Ebenda **191**, 322 (1939).

Neben dieser Möglichkeit der Erklärung muß freilich auch an eine direkte Wirkung der Glykoside auf den Herzmuskel gedacht werden. In früheren Untersuchungen konnte ich zeigen [7], daß an Katzen kumulative Wirkungen nach wiederholten Gaben schon bei täglicher Verabreichung von 3—5 % der tödlichen Digitalisdosis erzielt werden können. Bei dieser Dosierung ist praktisch die Möglichkeit einer Coronarverengerung eigentlich auszuschließen. Mein Mitarbeiter, Lü Fu hua [8] hat dann in systematischer Prüfung der Kumulationsbedingungen bei verschiedenen Dosierungsverhältnissen an Katzen festgestellt, daß die vorbehandelten Tiere eine kleinere tödliche „Auffülldosis" von Strophanthin bei der Nachtitration benötigen. Die „Restwirkung" war dabei oft größer als der Summe der kleinen Teildosen entsprach. Es war daher im Anschluß an Heubners Vorstellungen [9] und Begriff der „Allobiose" eine allobiotische Digitaliswirkung in Betracht gezogen worden, deren direkter Angriffsort allerdings der glatte Muskel selbst sein müßte und deren Ursache vielleicht in länger anhaltenden funktionellen Störungen oder in einer Umstimmung des Zellstoffwechsels zu sehen wäre. Heubner [10] selbst hat die Bedeutung dieser Möglichkeit einer allobiotischen Reaktion bei Digitalisglykosiden neuerdings ausführlicher erörtert.

In den Versuchen von Lendle [7] und von Lü Fu hua [8] waren übrigens die herdförmigen Nekrosen und Blutungen in der Herzmuskulatur, die als Ausdruck einer chronischen Vergiftung oder Nachschädigung in den Versuchen von Bauer und Fromherz [1,2] und von Büchner [3] aufgetreten waren, bei den niedrigeren Dosierungen nicht in Erscheinung getreten. Ein Teil der histologischen Präparate war freundlicherweise von Herrn Büchner selbst begutachtet worden. Auch Bauer und Reindell [5] geben in ihrer Arbeit an, daß die von ihnen beschriebenen Störungen in der Herzstromkurve durchaus nicht in Parallele zu der Zahl und Lokalisation der aufgetretenen histologischen Veränderungen standen.

Neuerdings hat Lindner [11,12] in ausgedehnten Versuchsreihen die Frage aufgenommen, ob die kumulative Wirkung so kleiner Digitoxindosen denn überhaupt als eine Schädigung betrachtet werden müsse. Er verabreichte Katzen wochenlang (bis 50 Tage) sehr kleine Gaben und konnte danach im Herzmuskel degenerative Veränderungen in einer bevorzugten Lokalisation, entsprechend den Nekroseherden von Büchner, feststellen. Er betrachtet diese Erscheinungen als reversible Veränderungen vielleicht auf der Basis von Stoffwechselstörungen, welche Übergänge zu den irreversiblen Nekrosevorgängen darstellen mögen. Er vertritt damit die Ansicht, daß die Kumulation kleiner Dosen (welche als thera-

[7] Lendle, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **180**, 518 (1936). — [8] Lü Fu hua: Ebenda **180**, 539 (1936). — [9] Heubner, W.: Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Mathem.-physik. Klas. 1922, S. 96; 1929, S. 60. — [10] Heubner, W.: Ber. I. Int. Congr. Ther. Union Bern 1937. — [11] Lindner, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 155 (1939). — [12] Lindner, W.: Ebenda **192**, 169 (1939).

peutische betrachtet werden können) und toxischer Dosen an einen einheitlichen Wirkungsmechanismus gebunden ist.

Auch Hahn [13] hat sich jetzt mit der Frage beschäftigt, ob die kumulative Nachwirkung als toxische Reaktion betrachtet werden soll. Er bemühte sich, bei funktioneller Prüfung der Herzen digitalis-vorbehandelter Tiere Anzeichen einer Schädigung nachzuweisen. Er konnte diesen Nachweis zwar nur begrenzt führen, aber jedenfalls konnte er in späteren Stadien der Kumulation keine Funktionsbesserung mehr erkennen, wie an den ersten beiden Tagen nach einer Digitoxingabe, wo nach Weese und Dieckhoff [14] noch eine Leistungssteigerung der Herzen auftreten soll vor Eintritt der sekundären toxischen Phase. Hahn meint im Anschluß an Weese [15] daher, daß eine chemische Kumulation der Substanz nur in den ersten 24 Stunden zu erwarten sei und daß alle späteren Nachwirkungen im Sinne von kleinen Teilschädigungen zu betrachten sind.

Es ist wohl gelegentlich von klinischer Seite Kritik an den pharmakologischen Versuchsergebnissen geübt worden, weil die Dosen, welche an Katzen noch zu toxischen Kumulationen führen können, so gering seien (3 % der tödlichen Dosis), so daß sie am Menschen, wo doch oft größere Dosen zu therapeutischen Zwecken verabreicht werden müssen, ja auch solche Schädigungen ausüben könnten. Edens [16] hat in einer sehr klaren Darstellung aber schon gezeigt, daß diese Auffassung nicht richtig ist. Die Strophanthindosierung am Menschen ist relativ viel geringer *. Bei einigen Fällen von jahrelang behandelten Herzkranken konnte Edens berechnen, daß die therapeutische Dosierung von K-Strophanthin etwa 0,003—0,008 mg/kg Mensch entsprochen hätte, während in meinen Versuchen 0,02 mg/kg kumulierend gewirkt haben. Es ist ferner auch daran zu erinnern, daß der Tierversuch gerade für die Digitaliskumulation sehr große Unterschiede aufweist (vgl. Literatur bei Lendle [7]). Nach neueren Ermittlungen von Hahn [13] über die Eliminationsbedingungen von Strophanthin am Hund läßt sich dieses Versuchstier zwischen Kaninchen und Katze einreihen und dürfte den Bedingungen des Menschen am nächsten stehen.

Wenn die Ergebnisse der Versuche an Katzen also auch nur beschränkt auf die Verhältnisse am Menschen übertragen werden können, so scheint uns die Prüfung der Kumulationsbedingungen an dieser Tierart aber wegen der Zuverlässigkeit der Reaktion gerade von besonderem Wert für die Feststellung der Bedingungen, unter welchen sich das Auftreten einer Kumulation beeinflussen läßt. Wir stellten uns nämlich die Aufgabe,

[13] Hahn, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 499 (1939). — [14] Weese, H., u. Dieckhoff: Ebenda **176**, 274 (1934). — [15] Weese, H.: Digitalis, Leipzig 1935. — [16] Edens: Klin. Wo. 1936, 1829.

* Diese Einschränkung gilt freilich nur für die Verhältnisse in Deutschland. In angelsächsischen Ländern wird auch heute zum Teil noch die Digitalis-Stoßtherapie mit sehr großen Gaben geübt, wobei selbst toxische Nebenwirkungen wie Erbrechen, Umkehr der T-Zacke, Extrasystolen usw. in Kauf genommen werden (vgl. Weese, H.: Ther. Gegenw. 1939, H. 6).

einmal zu prüfen, ob sich die Kumulationsgefahr durch gleichzeitige Gaben anderer herzwirksamer Pharmaca beeinflussen läßt. Für diese Zwecke schienen uns vor allem solche Stoffe geeignet, welche die Coronargefäße erweitern können und damit die Ernährungsbedingungen des Herzens begünstigen.

Besonders vielversprechend mußte diese gleichzeitige Behandlung sein, wenn die kumulative Wirkung auf einem Spasmus der Coronargefäße beruhen sollte. Es konnte damit also gleichzeitig die oben erörterte Hypothese einer entsprechenden Nachprüfung unterzogen werden. Dem gleichen Zweck dienten auch weitere Versuche, etwa in Parallele * zu der Digitaliskumulation bei chronischer Verabreichung von coronarverengernden Stoffen (Tonephin) ähnliche Nachwirkungen und vielleicht auch histologisch nachweisbare Schädigungen am Herzen zu erzeugen. Derartige Erfahrungen über spezifische Herzschädigungen bei chronischer Verabreichung von Hypophysenhinterlappen-Extrakten scheinen jedenfalls noch nicht in der Literatur beschrieben zu sein.

I. Kumulative Vergiftung mit Digitoxin an Katzen.

Methodisch sei kurz vorausgeschickt, daß als Versuchstiere zahme Katzen ausgewählt wurden, welche schon einige Tage im Stall gehalten waren, gute Freßlust zeigten und nicht krank oder schlapp erschienen. Digitoxin wurde täglich subcutan injiziert, zum Teil in Mischspritze mit dem „Gegenmittel". Das letztere wurde zum Teil im Laufe des Nachmittags noch ein zweites Mal injiziert, weil wir die coronarerweiternde Wirkung möglichst über eine längere Zeit erzielen wollten. An dem dem 6. Injektionstage folgenden Tage wurden die Tiere gewogen und anschließend wurde in Avertinnarkose (peroral 0,16—0,18 g/kg) und Ätherzudosierung eine Nachtitration mit g-Strophanthin ausgeführt, um die tödliche „Auffülldosis" zu ermitteln**. Einzelheiten über das Verfahren sind früher angegeben worden. Bei allen Versuchen wurde während der Vorbehandlung täglich das Verhalten der Versuchstiere kontrolliert (Erbrechen nach der Injektion, Freßlust, Allgemeinbefinden), um beginnende Schäden schon frühzeitig zu erkennen.

Von Digitoxin wurden zwei größere Dosen gewählt nämlich 8% der tödlichen Dosierung (0,024 mg/kg) und 10% (0,03 mg/kg). Bei diesen Dosierungen waren sichere kumulative Effekte zu erwarten und demgemäß auch die Wirkung von Gegenmaßnahmen sicherer zu beurteilen, als wenn die unterste kumulierende

* Es möge hier auch eine Literaturangabe von H. G. Armstrong und J. L. Henn (zit. nach Refer. in Dtsch. Milit.-arzt 1939, S. 427) berücksichtigt werden, nach welcher bei täglichen Versuchen mit Kaninchen in der Unterdruckkammer (6000 m Höhe) während 5 Wochen Versuchszeit vielfache Organschädigungen, vorwiegend Blutungen, erzielt werden konnten. An den Herzen der Versuchstiere scheint jedoch keine pathologische Veränderung eingetreten zu sein. Diese Tatsache ist für unsere Fragestellung von Bedeutung, weil demnach gehäufte partielle Anoxämien sich am Herzen keineswegs im Sinne kumulativer Digitalisschäden auswirken müssen.

** Die Dosenberechnung erfolgte bei den abgemagerten Katzen auf das Endgewicht. F. Hahn[17] hat neuerdings an umfangreichem Tiermaterial bei ähnlichen Auswertungsversuchen mit Strophanthin festgestellt, daß bei den geschädigten Tieren das „relative Herzgewicht" mit 4,5 g pro kg unverändert geblieben ist.

[17] Hahn, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 719 (1938).

Tabelle 1. Täglich 8% der letalen Digitoxindosis subcutan (0,024 mg/kg).

Nr.	Katzengewicht in g	Gleichzeitige Behandlung: Mittel	Gleichzeitige Behandlung: tägl. Dosierung pro kg	Beobachtungen in dieser Zeit	Gewichtsverlust in %	Letale Zudosierung von g-Strophanthin: mg/kg	Letale Zudosierung von g-Strophanthin: in Zeit	Restschädigung in % letal	Herzbefund
8	2350	—	—	kein Erbrechen, frißt gut	10	0,073	65′	26,9	—
15	3150	—		kein Erbrechen, frißt ab 4. Inj. schlechter	11,1	0,042	33′	58,1	-
21	1800	—	—	frißt nicht und erbricht ab 3. Inj.	19	0,042	44′	58,1	—
5	2400	Atropin. sulf.	1 mal 0,7 mg	kein Erbrechen, nach 2. und 4. Inj. frißt wenig	(+ 4)	0,071	62′	29,2	—
24	2800	„	2 mal 0,6 „	frißt nichts, ab 3. Inj. erbricht	14,3	0,037	37′	62,1	—
6	3240	Coffein natr. sal.	1 mal 25 „	kein Erbrechen, frißt gut	15	0,072	71′	27,6	—
25	2100	„ „ „	2 mal 15 „	erbricht nach 5. Inj., frißt nichts ab 3. Inj.	14,3	0,050	44′	49,6	±
7	2155	Ephedrin	1 mal 1,5 „	ab 4. Inj. frißt nichts, ab 5. Inj. erbricht	17,8	0,034	30′	66,0	+
26	2850	„	2 mal 0,7 „	erbricht nach 5. Inj., frißt nichts ab 3. Inj.	9	0,078	74′	22,2	
11	2230	Chinin hydr.	1 mal 15 „	kein Erbrechen, ab 4. Inj. frißt weniger	(+ 10)	0,089	75′	11,4	—
22	2800	„ „	2 mal 10 „	erbricht nach 5. und 6. Inj., ab 3. Inj. frißt nichts	10	0,077	77′	23,3	—
14	2550	Papaverin	1 mal 7 „	ab 4. Inj. frißt nichts, kein Erbrechen	11,7	0,059	54′	40,8	—
27	2700	„	2 mal 7 „	erbricht nicht; ab 3. Inj. frißt nichts, nach 5. Inj. frißt wieder	13,7	0,072	69′	27,9	-
30	2750	Veritol	2 mal 0,7 „	nach 2., 3. und 6. Inj. frißt nichts, erbricht nach 4. Inj.	12,7	0,058	50′	42,0	—

Tabelle 2. Täglich 10% der letalen Digitoxindosis subcutan (0,30 mg/kg).

Nr.	Katzengewicht in g	Gleichzeitige Behandlung: Mittel	Gleichzeitige Behandlung: tägl. Dosierung pro kg	Beobachtungen in dieser Zeit	Gewichtsverlust in %	Letale Zudosierung von g-Strophanthin: mg/kg	Letale Zudosierung von g-Strophanthin: in Zeit	Restschädigung in % letal	Herzbefund
4	2325	—	—	ab 2. Inj. frißt nichts. nach 3. Inj. S. L. krampft †	—	—	—	(100 %)	+
10	2670	—	—	erbricht am 2., 3. und 5. Tag, frißt kaum ab 3. Inj.	10	0,060	60′	40,4	—
20	1680	—	—	erbricht nach 4. Inj., frißt nichts ab 2. Inj., tot nach 4. Inj.	—	—	—	(100 %)	—
1	2860	Atropin sulf.	1 mal 1 mg	ab 3. Inj. frißt nichts, kein Erbrechen	21	0,044	37′	56,5	—
16	2550	„ „	2 mal 0,6 „	erbricht nach 2., 4. und 6. Inj., frißt nicht ab 2. Inj.	17,6	0,624	62′	37,6	+
2	2735	Coffein natr. sal.	1 mal 15 „	erbricht nach 3. Inj., ab 4. Inj. frißt nichts	16	0,063	61′	37,5	—
19	2600	„ „ „	2 mal 15 „	erbricht nicht, frißt gut oder mäßig	7,7	0,039	33′	60,7	—!
3	2350	Ephedrin	1 mal 1 „	nach 5. Inj. erbricht, ab 2. bis 4. Inj. frißt nichts	20	0,041	36′	58,8	—
18	2050	„	2 mal 0,6 „	nach 3., 5. und 6. Inj. erbricht, frißt nicht ab 1. Inj.	19,5	0,049	47′	50,9	(+)
9	2500	Chininum hydr.	1 mal 20 „	erbricht nach 3. und 5. Inj., frißt nichts ab 3. Inj.	4	0,023 (sehr tiefe Narkose!)	23′	77,5	—
23	1800	„ „	2 mal 12 „	frißt kaum ab 2. und 3. Inj., erbricht nach 6. Inj.	11	0,078	67′	21,9	—
28	1500	„ „	2 mal 12 „	erbricht ab 2. Inj., frißt kaum oder nichts ab 3. Inj., tot nach 6. Inj.	—	—	—	(100 %)	—!
13	2900	Papaverin	1 mal 10 „	kein Erbrechen, stumpf ab 4. Inj., frißt kaum	8,6	0,076	68′	23,8	—
17	1500	„	2 mal 7 „	ab 1. Inj. frißt wenig, ab 3. Inj. frißt nicht; tot am 5. Tag	—	—	—	(100 %)	(+)
29	1850	Veritol	2 mal 0,5 „	erbricht nach 3., 4. und 5. Inj., frißt nichts oder kaum nach 2. Inj.; tot nach 6. Inj.	—	—	—	(100 %)	+

Grenzdosis gewählt worden wäre. Bei dieser größeren Dosierung waren auch eher Coronarspasmen zu erwarten, so daß etwaige erfolgreiche Gegenmaßnahmen die Hypothese bestätigen konnten.

Als coronarerweiternde Gegenmittel wurden Stoffe aus verschiedenen Gruppen verwendet. Die Dosierung wurde nach Erfahrungen über tierexperimentelle Wirkungen gewählt. Die Zufuhr der Stoffe erfolgte entweder einmal am Tage gleichzeitig oder zweimal mit einer Nachdosierung am Nachmittag.

Alle Versuchsergebnisse mit denjenigen der gleichzeitigen Kontrollversuche ohne Gegenmaßnahmen wurden in Tabelle 1 und 2 zusammengefaßt. In diesen Tabellen sind auch die Angaben über das Allgemeinverhalten, die Gewichtsverluste während der Behandlung, die Bedingungen der Nachtitration und schließlich die makroskopischen Herzbefunde bei der Sektion mit aufgenommen. Für Tiere, bei denen der Tod ohne Nachdosierung im Verlauf der Behandlung eintrat, ist die „Restschädigung" mit (100 %) angegeben worden.

Die Werte der kumulativen Restschädigung in den beiden Tabellen zeigen eine starke Streuung. Es lassen sich keine auffallenden Abweichungen der Befunde für einzelne Pharmaca gegenüber den Kontrollversuchen ohne gleichzeitige Behandlung oder auch untereinander erkennen. Die Kontrollversuche lieferten vielleicht Werte, die an der oberen Grenze der Streuung liegen. Um zunächst einmal einen Überblick über die Streuung der Befunde zu erhalten, wurden aus jeder Tabelle die Mittelwerte für die Restschädigung in % und ihre Abweichungen festgestellt, worüber die Zusammenstellung in Tabelle 3 Auskunft gibt.

Tabelle 3.

Dosierung % letal	Versuchszahl	Mittelwert	Maximaler Wert	Minimaler Wert	Durchschnittl. Fehler
8	14	39	66	11,4	± 14,8
10	15	64,4	(100)	21,9	± 25,2

Verglichen mit diesen Mittelwerten zeigten die für die einzelnen Pharmaca gefundenen Kumulationsreste nur in einzelnen Fällen niedrigere Werte, die aber immer noch innerhalb der dreifachen durchschnittlichen Fehler liegen. Ferner zeigten die gleichen Pharmaca auch z. T. entsprechende Abweichungen nach oben. In Tabelle 1 konnte vielleicht Chinin eine günstigere Stellung einnehmen, das gleiche Mittel bietet aber in Tabelle 2 eher schlechtere Bedingungen. Ich halte es nicht für möglich, irgendwelche positiven Schlüsse im Sinne einer Kumulationshemmung aus dem vorgelegten Zahlenmaterial zu begründen. Auch das Allgemeinbefinden der Tiere bot keine typischen Unterschiede mit Ausnahme vielleicht für das Papaverin. Die mit Papaverin behandelten Katzen zeigten auffallenderweise kein Erbrechen.

Einer besonderen Erörterung bedürfen noch die pathologischen Herzbefunde, über welche in Tabelle 1 und 2 einige kurze Angaben enthalten

sind. Es konnten, wie die folgende Aufführung von Protokollauszügen in Tabelle 4 zeigt, vielfach makroskopisch erkennbare Blutungen festgestellt werden. Also auch diese grobe Kennzeichnung von kumulativen Schädigungen bei höheren Dosierungen konnten durch die verschiedene Behandlung nicht verhütet werden. Eine sichere Beziehung zwischen der ermittelten Restschädigung und diesen Befunden besteht nicht. Es kann lediglich festgestellt werden, daß bei der höheren Digitoxindosierung (Tabelle 2) in 5 von 15 Fällen und bei der niedrigeren Dosierung (Tabelle 1) in 2 von 14 Fällen solche Schädigungen vorlagen. In einigen Fällen ist selbst bei spontanem Tod unter der Behandlung oder bei besonders hohen Restschädigungen keine anatomische Schädigung erkennbar geworden.

Tabelle 4. Makroskopische Befunde am Herzen.

Nr. 4. Herz klein und fest, kein Gerinnsel in den Kammern. Vereinzelte Blutpunkte in den Trabekeln und in den Papillarmuskeln der linken Kammer, einzelne auch in der Wand der rechten Kammer.

Nr. 7. Starke flächenhafte Blutung im Septum und deutlich Blutung in den Papillarmuskeln.

Nr. 17. Herz klein und fest. In der rechten Kammer kein Befund; in der linken Kammer kleine Blutpunkte in zwei Papillarmuskelspitzen.

Nr. 16. Herz enthält flüssiges Blut in beiden Kammern. Im rechten Ventrikel kein pathologischer Befund, im linken Ventrikel frische Blutungsherde von den Semilunarklappen in das Septum flächenhaft ausstrahlend. Vereinzelte Blutungen auch in den Papillarmuskelspitzen.

Nr. 18. Rechtes Herz ohne pathologischen Befund. Die linke Kammer zeigt einzelne kleine Blutungen in den Papillarmuskelspitzen.

Nr. 20. Alte Bronchitis und Lungenemphysem. Kein pathologischer Herzbefund.

Nr. 25. Einzelne kleine Blutungen in den Papillarmuskelspitzen.

Nr. 29. In beiden Kammern viele Blutungen in Papillarmuskeln und Septumwand.

II. Versuche mit Tonephin.

Die gefäßwirksame Fraktion von Hypophysenhinterlappenextrakten, das Tonephin, vermag die Coronargefäße zu drosseln, wie zahlreiche Untersuchungen am Ganztier und am isolierten Herzen erwiesen haben (Dietrich[18], Rößler[19], Melville und Mitarbeiter[20], Holtz[21] u. a.).

Im Zusammenhang mit unserer Fragestellung schien die Beobachtung von Smith[22] und Pardee[23], daß in der Herzstromkurve nach Tonephininjektionen typische Veränderungen im Sinne eines hohen S. T.-Abganges (Pardee-Zacke) auftreten können, von besonderem Interesse, weil derartige Befunde ja auch gelegentlich nach hohen Digitalisgaben beschrieben

[18] Dietrich: Z. exper. Med. **90**, 703 (1930). — [19] Rößler u. Antopol: Ebenda **94**, 453 (1934). — [20] Melville u. Mitarbeiter: Arch. internat. Pharmacodynam. **44**, 316 (1933); **64**, 86 (1938). — [21] Holtz, P.: J. Physiol. (Brit.) **76**, 149 (1932). — [22] Smith: Arch. internat. Med. **22**, 8 (1918); **25**, 673 (1920). — [23] Pardee: Ebenda **26**, 244 (1920).

worden sind. Sie werden mit einer Coronarinsuffizienz in Zusammenhang gebracht (Gruber und Kountz[24]).

Solche coronarverengernde Reaktionen dürften auch die Ursache für die tödlichen Vergiftungen mit Hypophysenhinterlappenextrakten sein *. Die akute Toxizität von Tonephin ist aber nicht besonders groß. Intravenöse Gaben von 15—25 mg/kg werden als tödlich betrachtet. Kaninchen und Hunde sollen empfindlicher als Katzen sein. Über chronische Schäden bei wiederholten Gaben von Tonephin und ähnlichen Präparaten scheint außer sklerotischen Gefäßveränderungen nichts bekannt zu sein (vgl. die Literaturangaben bei O. Schaumann in Heffter-Heubners Handb. d. exp. Pharmakologie, Ergänzungsbd. Nr. III, S. 76).

Wir verdanken für unsere Versuche Herrn Schaumann die Überlassung von zwei weitgehend gereinigten Tonephinpräparaten, welche 1 bzw. 2 Einheiten pro 1 mg enthielten. In einigen ersten orientierenden Versuchen prüften wir die Toxizität bei wiederholten Injektionen an Kaninchen und Katzen. Am Kaninchen wurde Tonephin intravenös innerhalb von 2 Minuten injiziert. Es zeigte sich danach ein typisches Vergiftungsbild: die Tiere legten sich flach auf den Bauch mit schlaffen Vorderextremitäten. Dabei hing auch der Kopf völlig schlaff herab, so daß er oft auf dem Boden lag. Dieses Bild gleicht weitgehendst demjenigen, welches man nach Digitoxininjektionen am Kaninchen beobachten kann. Santesson[25] hat dafür eine Lähmung der Nackenmuskulatur durch Digitoxin beim Kaninchen verantwortlich gemacht. Der Puls der tonephinbehandelten Tiere war in diesem Stadium langsam und unregelmäßig, die Atmung stark beschleunigt. Später folgte meist eine akute Diarrhoe. Nach 10—20 Minuten waren die Lähmungserscheinungen schon weitgehend abgeklungen. Täglich wiederholte Gaben wurden relativ gut vertragen, wie die folgende Aufstellung in Tabelle 5 zeigt.

Tabelle 5. Tonephin intravenös am Kaninchen.

Gewicht	Einh./kg	Anzahl der Injektionen	Gewichtsverlust
2105	2	10	14,5
1975	5	10	17
3000	10	10	20
2040	20	10	12
1750	60	5	31 (verstarb am 3. Tag nach der letzten Inj.)

* Nach neuen Angaben von K. J. Melville [Journ. of Pharm. a. exp. Ther. **66**, 107 (1939)] sollen die Veränderungen in der Herzstromkurve des Hundes nach Verabreichung von Vasopressin eher für eine unmittelbare Herzmuskelschädigung sprechen. Am Herz-Lungenpräparat soll ferner das Schlagvolumen des Herzens schon vor dem Eintritt der Coronarspasmen absinken.

[24] Gruber u. Kountz: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **27**, 161 (1929).

[25] Santesson u. Strindberg: Skand. Arch. Physiol. **35**, 51 (1918).

Die Tiere erholten sich bald nach der Behandlung, nur das letzte Tier mit stärkster Dosierung verstarb. Der Sektionsbefund zeigte keine sichere Todesursache. Das Herz wies makroskopisch keine Blutungen auf.

Ähnliche Versuche wurden mit Katzen ausgeführt, die das Tonephin aber intramuskulär in steigenden Einzeldosen von 5—100 Einheiten pro kg erhielten. Diese Gaben wurden ohne Nachschädigung vertragen. Ebenso konnte bei wiederholter Verabreichung (7×40 Einheiten, 6×50 E. und 10×60 E./kg) keine schweren Störungen beobachtet werden. Erbrechen wie bei der Digitaliskumulation trat nie auf. Die Gewichtsverluste überschritten nicht 5—10 %. Die Versuchstiere zeigten nach den Injektionen zunächst eine Schmerzreaktion (der NaCl-Gehalt der Präparate verursachte eine Hypertonielösung). Innerhalb der ersten 30 Minuten nach den Injektionen folgten dann einige Allgemeinstörungen (Unruhe und Ataxie, später Stumpfheit) und Anzeichen von Gefäßspasmen (blasse Nasenspitze und Mundschleimhäute).

Einige weitere Versuchsreihen wurden in gleicher Weise wie sonst zur Prüfung der Digitaliskumulation angesetzt, indem den Katzen täglich eine bestimmte Tonephindosis intramuskulär injiziert wurde und am siebenten Tag die tödliche Auffülldosis von g-Strophanthin bei intravenöser Nachtitration ermittelt wurde. In einem Teil dieser Versuche wurde auch neben Tonephin noch je eine kleine Digitoxindosis verabreicht. Diese betrug mit 0,02 mg/kg nur 6,6 % und mit 0,015 mg/kg nur 5 % der tödlichen Dosierung. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Die Befunde dieser Reihe zeigen für die reine Tonephindosierung keine Andeutung einer Herzschädigung in einer Verminderung der Strophanthin-Auffülldosis. Bei der Kombination von Tonephin mit Digitoxin trat aber eine deutliche Verstärkung seiner Wirksamkeit auf. Diese Versuchstiere erbrachen zwar noch nicht, sie zeigten aber regelmäßig Allgemeinstörungen und eine stärkere kumulative Restwirkung, die z. T. größer ist als bei den in Tabelle 1 und 2 für höhere Digitoxindosen gefundenen Werte. Es kann also angenommen werden, daß die coronarverengernde Wirksamkeit des Tonephins selbst noch keine digitalisähnliche Kumulation bewirkt, aber die kumulative Digitoxinwirkung bei gleichzeitigen Gaben verstärken kann *. Der makroskopische Herzbefund war in allen Fällen negativ. Von sonstigen Sektionsbefunden wäre nur bei Tier Nr. 5 und etwas schwächer bei Tier Nr. 6 eine lehmfarbene Rindenschicht der Niere zu erwähnen (Verfettung).

* Diese verstärkte Kumulation muß keineswegs auf einer additiven Coronarverengerung durch die beiden Pharmaka beruhen. Osterwald hat gerade neuestens [Z. f. Kreislaufforsch. **31**, 225 (1939)] festgestellt, daß kleine Strophanthingaben bei experimenteller Coronarinsuffizienz z. B. durch Astunterbindung, Injektion von Hypophysenhinterlappenextrakt oder Chloroformschädigung die Herzdurchblutung erhöhen können.

Von Katze Nr. 4, 5, 6 und 7 wurden histologische Schnitte von Herz, Leber und Niere hergestellt. Herr Dozent Dr. med. Kaiserling vom hiesigen Pathologischen Institut übernahm in liebenswürdiger Weise deren Durchsicht und stellte uns folgende zusammenfassende Beurteilung zur Verfügung:

Katze 4. Herz. Mikroskopisch zeigen sich an dem vorliegenden Schnitt an mehreren Stellen mitten in der Muskulatur gelegene Herde, in welchen die Zellen vermehrt und die Muskulatur geschädigt ist. Die Zellinfiltrate haben beinahe Knötchenform. Man sieht in diesen Herden aufgequollene vergrößerte Muskelzellen mit unscharfen Kernen sowie große und kleine Lymphocyten, vermehrte Kapillarendothelien sowie reichlich große und kleine Fibroblasten und Fibrocyten. Im Zentrum der Zellanhäufung haben die Herzmuskelfasern die Längs- und Querstreifung verloren. Es finden sich am vorliegenden Schnitt 14 von diesen Herden.

Niere. Glomeruli, Hauptstücke und übriges sekretorisches Parenchym intakt. Ganz vereinzelt herdförmig sieht man in der Nachbarschaft der Glomeruli sowie zwischen den Hauptstücken sehr dichte Lymphocyteninfiltrate als Zeichen herdförmiger chronischer interstitieller Entzündung. Die unmittelbar neben diesen Zellherden gelegenen Glomeruli sind zellarm klein und etwas hyalinisiert. Ganz vereinzelt sieht man auch interstitielle Rundzelleninfiltrate in Mark und Rinde.

Leber. Leberzellbälkchen intakt, vereinzelte kleine Gallenthromben. Geringgradige Vermehrung der Lymphocyten im Glissonschen Gewebe.

Katze 5. Herz. Mikroskopisch sieht man am Schnitt zwei zellige Herde, einen größeren und einen kleineren. Die Zellen liegen nicht perivaskulär sondern wie bei Tier 4 interstitiell, d. h. zwischen den Muskelfasern, welche sie auseinander gedrängt haben. Man sieht hier außer den oben beschriebenen Zellen auch noch polymorphkernige Leukocyten. Auch hier sind die

Tabelle 6. Kumulation bei Vorbehandlung mit Tonephin und Digitoxin.

Tägl. subcutane Injektion an Katzen. Nachtitration mit g-Strophanthin am 7. Tage. Alle Dosen pro kg.

Nr.	Gewicht in g	Tonephin in Einheiten	Digitoxin in mg	Beobachtungen	Gewichtsverlust in %	Letale Strophanthindosis		Restschädigung in %	Makroskop. Herzbefund
						mg/kg	Zeit		
1	3530	20	0,020	kein Erbrechen, frißt nicht nach 4. und 6. Inj.	12,7	0,040	34′	60	—
4	2200	30	0,020	kein Erbrechen, frißt nicht ab 2. Inj.		† nach 4. Inj.		(100)	—
2	2650	20	0,015	kein Erbrechen, frißt meist gut	2,0	0,051	41′	49	—
3	3100	30	0,015	kein Erbrechen, frißt nicht ab 3. Inj.	14,5	0,065	62′	35	
5	2100	30	—	keine Veränderungen	4,8	0,145	130′	—	—
6	1800	40	—	„	—	0,096	70′	4	—
7	2100	50	—	„	8.6	0,094	78′	6	—

Muskelfasern im Bereich der Zellanhäufungen ohne klare Zeichnung. Das Bild entspricht genau einer herdförmigen interstitiellen Myocarditis.

Niere. In den Kapseln der Glomeruli vereinzelt etwas scholliges, teils homogenes Exsudat. Gefäße intakt. Die Epithelien der Hauptstücke sind geschwollen, man sieht reichlich Vakuolenbildungen, wie bei der hydropischen Quellung. Es kann jedoch auch an den Hauptstücken nur erhöhter Funktionszustand vorliegen. Rundzelleninfiltrate nicht erkennbar.

Leber. Hochgradige, vorwiegend periphere Stauung, ganz geringgradige Lymphocytenvermehrung im Glissonschen Gewebe.

Tier 6. Herz. Am vorliegenden kleinen Gewebsschnitt keinerlei krankhafte Veränderungen erkennbar.

Niere. Reichlich Exsudat in fast sämtlichen Glomeruluskapseln. Hauptstücke intakt, Gefäße intakt. Drei größere Zellinfiltrate im Nierenmark. Es handelt sich dabei um Lymphocyten und vermehrte Gefäßwandzellen. Kanälchenstruktur an diesen Stellen aufgehoben.

Leber. Mäßige allgemeine, mehr zentrale Blutstauung. Geringgradige feintropfige, periphere Verfettung. Keine Rundzelleninfiltrate erkennbar.

Tier 7. Herz. Keine krankhaften Veränderungen erkennbar.

Niere. Geringe Mengen von Exsudat in den Kapselräumen einiger Glomeruli, leichte Schwellung der Hauptstücke mit Vacuolenbildungen. Allgemeine Stauung. Keine Zellinfiltrate erkennbar.

Leber. Hochgradige allgemeine überwiegend periphere Blutstauung. Keinerlei Zellansammlungen. Gefäße und Leberzellen intakt.

Als Ergebnis dieser histologischen Untersuchung kann festgehalten werden, daß durch die wiederholte Tonephingabe am Herzen keine so typischen Veränderungen erzielt wurden, wie sie von Büchner u. a. für Digitalisschädigungen nachgewiesen worden sind (Blutaustritte, Nekrosen usw.). Eine stärkere Herzmuskelschädigung und zellige Infiltration wurde nur bei Tier Nr. 4 gefunden, das gleichzeitig Tonephin und Digitoxin erhalten hatte und schon nach der vierten Injektion ohne Nachtitration mit Strophanthin verstorben war.

Die Leber der Versuchstiere zeigte keine pathologischen Veränderungen, wohl aber die Niere. Bei Katzen Nr. 5, 6 und 7, welche die höheren Tonephindosen erhalten hatten, wurde eine typische Veränderung an den Glomeruli beschrieben, nämlich eine fibröse Exsudation in die Kapsel. Das Parenchym der Niere ließ dagegen keine stärkere Schädigung erkennen. Diese nierenschädigende Wirkung entspricht der bekannten Erfahrung, daß Hypophysenhinterlappenextrakte diuresehemmend wirken. Die Erklärung dafür wird nach pharmakologischen Analysen in einem peripheren Angriff des Tonephins am Nierenparenchym gesehen. Manche Autoren halten auch die Gefäßwirkung des Tonephins für die Ursache der Diuresehemmung. Die vorliegenden Erfahrungen über Schädigungen bei wiederholten Dosierungen von Tonephin zeigen zu mindestens für seine toxische Wirkung eine Beteiligung des Gefäßapparates in der Niere.

Zusammenfassende Erörterungen.

Ausgehend von der Hypothese, daß die bei der toxischen Digitaliskumulation nachgewiesenen herdförmigen Schädigungen des Herzmuskels durch eine partielle Anoxämie infolge Drosselung der Coronargefäße bedingt sein sollen, wurden Versuche ausgeführt, durch gleichzeitige Gaben von Mitteln, welche die Coronargefäße erweitern, die Digitoxinkumulation abzuschwächen. Die Prüfung der Kumulationsgröße erfolgte dabei mittels Bestimmung der tödlichen Auffülldosis von g-Strophanthin im Anschluß an eine sechstägige Vorbehandlung der Katzen. Es konnte bei diesen Versuchen keine Veränderung der Kumulationsneigung erzielt werden.

Diese Erfahrungen bestätigen also nicht die Auffassung von der relativen Coronarinsuffizienz als Ursache der toxischen Digitaliskumulation, sondern weisen eher darauf hin, daß die Herzmuskelveränderungen vielleicht die Folge einer unmittelbaren Digitaliseinwirkung sind, daß demgemäß auch die ST-Veränderungen im Elektrocardiogramm nach kleinen, noch kumulierenden Digitalisdosen nicht allein auf Coronarspasmen zurückgeführt werden dürfen. Es ist auch durchaus wahrscheinlich, daß gewisse chemische Einwirkungen direkt am Herzmuskel die sogenannten „monophasischen Deformationen" der Aktionsstromkurve auslösen können. Von Schütz[26] sind sie experimentell durch mechanische Verletzungen erzeugt worden und von Sibilla[27] sind sie durch gröbere, örtliche chemische Eingriffe erzielt worden. Ferner sind neuerdings durch Hu, Lien und Li[28] bei Froschherzen, die keine Coronarversorgung besitzen und deren schwammartig gebaute Muskulatur vom Endocard aus mit Sauerstoff versorgt werden kann, auch hyaline Degenerationserscheinungen, aber keine Nekrosen nach Strophanthingaben beschrieben worden.

Weitere Versuche zielten darauf hin, durch wiederholte große Gaben von Tonephin, welches Coronarspasmen auslöst, auch Schädigungen entsprechend der Digitaliskumulation zu erzielen. Es gelang nicht, derartigen Schädigungen mit Hilfe einer erhöhten Strophanthinempfindlichkeit nachzuweisen. Dagegen konnte eine Digitoxinkumulation bei Kombination mit Tonephin etwas verstärkt werden.

Histologische Organuntersuchungen zeigten bei den wiederholt mit Tonephin behandelten Katzen keine typischen Herzveränderungen, wie sie für die Digitalisschädigung beschrieben worden sind. Nur in einigen Fällen traten herdförmige, zellige Infiltrationen neben degenerativen Veränderungen am Herzmuskel auf. Bemerkenswerter erscheinen die histologischen Befunde an den Nieren dieser Versuchstiere (Exsudation in die Kapsel der Glomeruli), welche dem pharmakologischen Angriff des Tonephins an der Niere entsprechen. Bei der kumulativen Digitalisschädigung sind solche Befunde nicht nachgewiesen worden.

---

[26] Schütz, E.: Luftfahrtmed. **3**, 132 (1939); Kongreßrefer. Nauheim 1939. — [27] Sibilla: Cuore **22**, Nr. 10 (1938). — [28] Hu, Lien u. Li: zit. nach Ber. Physiol. **95**, 113 (1936).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Basel.
(Vorsteher: Prof. Dr. H. Staub.)

Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Leukopenie und Leukocytose nach intravenöser Glykogenzufuhr.

IX. Mitteilung über Blutglykogen.

Von

K. Bucher und **H. Staub.**

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Januar 1940.)

Die vorliegende Arbeit bringt weitere Versuche zur Pharmakologie intravenös zugeführten Glykogens am Kaninchen. Vor allem sollen die nachstehenden Ergebnisse noch genauere Einsicht in den Mechanismus der Leukopenie im zirkulierenden Blut nach intravenöser Glykogenzufuhr geben. Staub, Mezey und Golandas (1) haben dieses Phänomen der peripheren Leukopenie nach intravenöser Zufuhr kolloidaler Kohlehydrate (Glykogen, Stärke, Gummi arabicum) bei Kaninchen und Hunden gefunden und auf seine allgemeine biologische Bedeutung hingewiesen. Staub (1) hat die Theorie aufgestellt, daß diese Leukopenie immer dann auftritt, wenn blutfremde Makromoleküle oder Molekülaggregate in die Blutbahn gelangen. Die Makromoleküle werden von den Leukocyten adsorbiert oder phagocytiert; die Leukocyten werden dadurch in ihrer Struktur dahin verändert, daß sie sich dem engen Lumen der Kapillargefäße weniger gut anpassen können und in den Haargefäßen steckenbleiben. Bei einem solchen Mechanismus der Leukopenie im zirkulierenden Blut müssen zuerst hauptsächlich die großen myeloischen Formen steckenbleiben, und tatsächlich haben ja unsere Versuche auch ergeben, daß in erster Linie die myeloischen Zellen (manchmal bis auf 0%) und in geringerem Grade die kleinen Lymphocyten aus dem zirkulierenden Blut verschwinden.

Aus weiteren experimentellen Befunden von Staub und Bucher (2), Bucher (3) ging hervor, daß die Lunge das spezifische Organ ist, das die Leukocyten zurückhält. Es konnte gezeigt werden, daß die Lunge auch dann die Leukocyten retiniert, wenn sie nicht erstdurchströmtes Kapillargebiet für das glykogenangereicherte Blut ist. Sowohl am Starling'schen Herz-Lungenpräparat, wie an isoliert durchströmter Lunge konnte das Leukopeniephänomen nachgewiesen werden.

Wir konnten ferner zeigen, daß die Leukocyten nur vorübergehend in der Lunge retiniert werden. Nach wenigen Minuten gibt die Lunge die Leukocyten wieder ab. (Versuche an isoliert durchströmter Lunge und am Herz-Lungenpräparat.) Durch wiederholte Injektionen von Glykogen gelang es, Leukocytosen von 50000 und mehr hervorzurufen. Die Hyperleukocytose wurde als überschießende Reaktion des Knochenmarkes gedeutet; das Knochenmark reagiert offenbar auf die akute Hypoleukocytose mit vermehrter Abgabe von z. T. unreifen weißen Blutzellen.

Die nachstehenden Untersuchungen beschäftigen sich vorwiegend mit der Verteilung des Glykogens auf die verschiedenen Blutbestandteile, mit dem Verhalten des Glykogens im Blut und mit Transportfunktion der Leukocyten.

I. Teil. Methodik.

Alle Versuche sind am Kaninchen vorgenommen.

Zur genaueren Feststellung der Glykogenverteilung auf die verschiedenen Blutbestandteile mußte eine besondere Methodik ausgearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurden die Bestimmungen von Golandas (4) über den normalen Blutglykogengehalt von Kaninchen und über das Verhalten von Glykogen im Blut beim Stehen in vitro wiederholt.

Blutglykogengehalt nüchterner normaler Kaninchen:

4,9 4,8 3,6 4,5 4,4 4,8 4,4 3,9 3,2 3,9 3,2 5,2 4,8 6,4 6,6 6,8 3,2 6,9 4,5 D = 4,7 mg%

Der durchschnittliche Glykogengehalt im Blut des unbeeinflußten, nüchternen Kaninchens beträgt 4,7 mg%. Golandas fand bei 70 Bestimmungen einen Durchschnittswert von 9,1 mg% am Kaninchenvollblut. Den Unterschied dieser beiden Durchschnittswerte können wir uns nicht erklären. Methodische Unterschiede bestehen nicht, vielleicht kommen andere Ernährungsweise oder andere Kaninchenrassen in Frage.

Wir haben weiter das Verhalten des Blutglykogens beim Stehen in vitro nochmals untersucht (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. Glykogenwerte des Nüchtern-Blutes unbeeinflußter Kaninchen.

Prot.-Nr.	Sofort bestimmt mg%	Nach 3 Std. bestimmt mg%
2/a	4,9	4,8
4/b	4,5	4,6
5	4,2	4,3

Dreistündiges Stehen in vitro ändert demnach den Glykogengehalt des Blutes nüchterner, unbeeinflußter Kaninchen nicht.

Der Befund stimmt mit demjenigen von Golandas (4) (s. Tabelle 8 der Arbeit von Golandas) überein, der nach 8 Stunden Stehen keine wesentliche Änderung im normalen Glykogengehalt von Menschenblut fand.

Im Weitern wird das Verhalten des in vivo mit Glykogen angereicherten Blutes beim Stehen in vitro untersucht (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2. Glykogenzufuhr in vivo; Verhalten des erhöhten Blutglykogens in vitro.

Prot.-Nr.	Dieselbe Probe	
	Sofort mg%	Nach 1 Std. mg%
2/a	66,5	26,0
2/b	34,8	20,6
4/b	36,7	20,4
5	68,4	28,0
5	31,4	24,6
5	20,2	19,0

Dazu wird nüchternen Kaninchen intravenös Glykogen injiziert; 5 Minuten nach der Injektion wird das Blut entnommen. In einer ersten Probe wird der Glykogengehalt sofort bestimmt, in einer zweiten erst nach einstündigem Stehen in vitro bei Zimmertemperatur. Die Gerinnung wird mit Na-Citrat oder Heparin verhindert.

Durch intravenöse Glykogenzufuhr glykogenangereichertes Kaninchenblut hat die Fähigkeit, beim Stehen in vitro bei Zimmertemperatur innerhalb einer Stunde Glykogen in erheblichem Maße zum Verschwinden zu bringen. Dabei ist die Geschwindigkeit des Abbaues offenbar abhängig von der Glykogenkonzentration.

In der folgenden Versuchsreihe (s. Tabelle 3) wird gezeigt, daß das Kaninchenblut nicht nur bei Glykogenzufuhr in vivo, sondern auch bei Glykogenzusatz in vitro ein wesentliches Abbauvermögen für Glykogen besitzt.

Das frisch entnommene Kaninchenblut wird für diese Versuchszwecke zu $^1/_5$ mit einer 3,8%igen, blutisotonischen Na-Citratlösung versetzt und zu dieser Blut-Citratmischung Glykogen zugegeben. Die Menge des Glykogens ist in mg% angegeben (100 mg% bedeuten 5 mg Glykogen auf 5 ccm des Gemisches). Nach einstündigem Stehen einer Kontrollprobe, zusammen mit der mit Glykogen versetzten Probe, wird in beiden der Glykogengehalt bestimmt, angegeben in mg%.

Tabelle 3.

Prot.-Nr.	Zugeführtes Glykogen in mg%	Glykogengehalt im Blut-Citratgemisch nach 1 Std. Stehen in vitro bei Zimmertemperatur in mg%		
		Kontrolle ohne Glykogenzusatz	Nach Glykogenzusatz	
			Sollwert	Gefundener Wert
62	75	6,4	81,4	31,4
12/4	20	4,3	24,3	6,5
12/4	20	5,1	25,1	8,1
12/3	100	4,8	104,8	18,0

Demnach ist normales Kaninchenblut imstande, in vitro zugesetztes Glykogen in vitro ausgedehnt zum Verschwinden zu bringen (bis zu etwa 80% innerhalb der ersten Stunde).

Methode zur Bestimmung des relativen Glykogengehaltes der einzelnen Blutbestandteile.

Aus den ausgeführten Vorversuchen ist ersichtlich, daß in vitro oder in vivo dem Blut zugegebenes Glykogen, beim Stehenlassen solchen Blutes außerhalb des Körpers, mit beträchtlicher Geschwindigkeit verschwindet.

Dieser, offenbar fermentative Glykogenabbau im Blut in vitro, läßt es als recht schwierig und unzuverlässig erscheinen, die Glykogenverteilung auf die einzelnen Blutbestandteile direkt zu bestimmen. Während der Trennungsmethoden (Zentrifugieren, Abpipettieren, Waschen) wird nämlich fortwährend Glykogen abgebaut.

Die hier beschriebene Methode bestimmt nun nicht die absoluten Glykogenwerte der einzelnen Blutbestandteile im Moment der Blutentnahme, sondern die Glykogenwerte nach gleichlangen vorbereitenden Maßnahmen bis zum Einbringen der isolierten Blutbestandteile in die heiße 60 %ige Kalilauge. Wir erhalten deshalb zu niedrige Glykogenwerte, aber eine richtige Relation in der Glykogenverteilung auf die einzelnen Blutbestandteile.

Das Glykogen in Vollblut, Plasma und Erythrocyten wurde direkt bestimmt; der Leukocyten-Glykogengehalt als Differenz zwischen Plasma + Erythrocyten-Glykogengehalt einerseits und Glykogengehalt des Vollblutes andererseits errechnet.

Die „Differenz-Methode" wurde der eventuell möglichen direkten Bestimmung des Leukocytenglykogengehaltes vorgezogen, weil im unbeeinflußten Blut die Erythrocyten, im glykogenangereicherten Blut das Plasma überwiegend glykogenreich ist und die Leukocyten deshalb sehr sorgfältig gereinigt werden müßten. Die Dauer dieses Isolierprozesses würde einen eventuellen Glykogengehalt der Leukocyten meist zum Verschwinden bringen. Zudem ist im Stadium der peripheren Leukopenie mit 300 und weniger Zellen im cmm die Schicht der weißen Blutkörperchen zu fein, als daß sie gesondert abgehoben werden könnte. Die Genauigkeit der Methode steht und fällt mit der Zuverlässigkeit der Bestimmung der Plasma Erythrocyten-Relation, denn die quantitative Bestimmung des Glykogengehaltes der isolierten Blutbestandteile hat eine genügend große Genauigkeit. Damit die Plasma-Erythrocyten-Relation möglichst genau festgestellt werden konnte, wurde diese Beziehung immer an der für Kaninchen großen Menge von 6 ccm Blut bestimmt.

Die richtige Bestimmung der Verteilung auf die einzelnen Blutbestandteile ist für die vorliegende Fragestellung über den Verbleib der Makromolekel im Blut das wesentliche; deshalb kann auf absolute Werte im Moment der Blutentnahme verzichtet werden.

Technische Einzelheiten der Methodik.

In einen Zylinder mit eingeschliffenem Glasstopfen wird mit einer Pipette eine genau bekannte Menge (beispielsweise 2,5 ccm) einer 3,8%igen (Kaninchenblut-isotonischen) Natrium-Citratlösung gebracht. Dazu wird aus der Kaninchenohrvene Blut zugetropft, bis das Verhältnis Blut zu Citratlösung etwa 5 zu 1 ist. (Je mehr Citratlösung vorgelegt wird, um so sicherer wird die Gerinnung verhindert, aber um so größer wird auch der

eventuelle Umrechnungsfehler.) Nun wird der oberste Meniskusrand mit feiner Feile am Zylinder markiert, so daß später wieder bis zur Marke mit einer entsprechenden Plasma-Citratlösung nachbürettiert und somit zugeführte Blutmenge und Verdünnung genau bestimmt werden können.

Der Vorteil des Verdünnens mit einer isotonischen Citratlösung liegt darin, daß das Blut nicht hämolysiert, kein Fibrin sich bildet und beim Zentrifugieren eine saubere Schichttrennung zwischen Plasma, Leukocyten und Erythrocyten erreicht wird.

Durch öfteres sorgfältiges Drehen und Kippen des Zylinders, ohne daß Schaumbildung auftritt, wird gut gemischt (eventuell mit Glasstab), und dann die Proben für die Bestimmung des Vollblut-Glykogengehaltes entnommen. Bei Normalblut werden Proben von 1,0 ccm entnommen; muß man bei höherem Glykogengehalt weniger vorlegen, dann wird immer unmittelbar vor Zusetzen der 60%igen KOH mit Ringerlösung auf 1,0 ccm ergänzt, damit die entstehende KOH-Konzentration immer die gleiche ist. (Die Proben werden vorläufig bei Zimmertemperatur beiseite gestellt.) Nun werden in ein englumiges, möglichst langes Zentrifugierglas beispielsweise 6 ccm der homogenen Blutmischung abpipettiert und bei 3500 Touren 10 Minuten zentrifugiert. Zugleich werden die Proben für das Vollblut mitzentrifugiert. Die Wichtigkeit dieser Maßnahme, nämlich das Mitzentrifugieren der Vollblutproben, erhellt aus Abb. 1 und Tabelle 4.

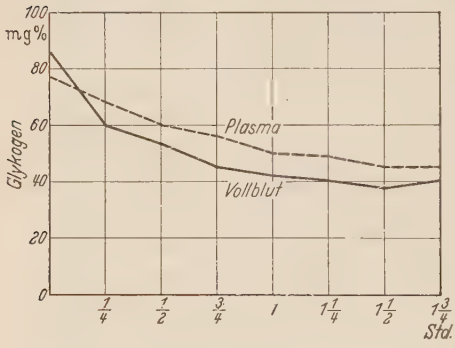


Abb. 1.

Zu Abbildung 1. Es wurden zu 5,0 ccm 3,8%ige Natriumcitratlösung 20 ccm Blut fließen gelassen, die Emulsion homogenisiert und die Hälfte davon scharf abzentrifugiert. Jetzt setzten wir zu acht Proben Blut-Citratgemisch von 1,0 ccm und zu acht Proben Plasma-Citratgemisch von 0,7 ccm je 0,2 ccm einer 1,5‰igen, isotonisch gemachten Glykogenlösung. Die Proben werden durch Schütteln gut gemischt und in der Folge je nach einer Viertelstunde eine Probe mit KOH versetzt und gekocht. Das Verhältnis 1,0 Vollblut zu 0,7 Plasma wurde so gewählt, weil sich gezeigt hat, daß durchschnittlich 1 ccm des mit $^1/_5$ Citratlösung verdünnten Blutes 0,3 ccm Erythrocyten enthält. Dadurch ist in beiden Proben der Prozentgehalt des Plasma an Glykogen ungefähr derselbe. Dies scheint allein maßgebend zu sein, da, wie später gezeigt wird, die Erythrocyten selbst im glykogenangereicherten Blut ihren Glykogengehalt kaum ändern.

Die Kurven zeigen, daß der Verlauf des Glykogenabbaues im glykogenangereicherten Citratplasma etwas verschieden ist, je nachdem das Plasma im Verein mit Formelementen des Blutes abbaut oder nicht.

Tabelle 4. Einem Kaninchen wird etwa 200 mg% Glykogen intravenös injiziert. Nach 5 Minuten wird Blut entnommen (zu 3,8% Citratlösung fließen gelassen). Etwa die Hälfte der Mischung wird sofort zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Nach 1 und 2 Stunden wird je der Glykogengehalt bestimmt, und zwar des Plasma, das erst kurz vor der Bestimmung aus dem Vollblut abzentrifugiert wurde, und des Plasma, das von Anfang an separiert war.

Tabelle 4.

Prot.-Nr.	Plasma jeweils aus Vollblut	Plasma von Anfang an ohne Formelemente	
48/a	85,6		Ausgangswert
	68,5	74,1	1 Std. } Stehen bei Zimmertemp.
	51,0	53,3	2 Std. }

Wiederum ist ersichtlich, daß Plasma + Formelemente zugeführtes Glykogen etwas schneller abbauen als Plasma allein.

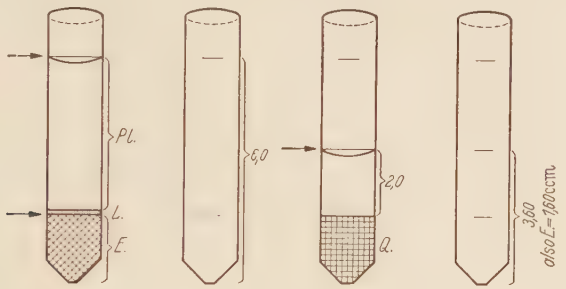


Abb. 2.

Die Vollblutproben werden also mitzentrifugiert, damit wir alle Proben nach gleich langem Stehen unter genau gleichen Bedingungen zur Glykogenbestimmung bringen können. Auf diese Weise wird immer die ursprüngliche und richtige Relation im Glykogengehalt der einzelnen Blutbestandteile erhalten; denn wenn alle Proben zur gleichen Zeit zentrifugiert werden und isolierte Erythrocyten zur gleichen Zeit mit KOH versetzt werden, spielt der eben konstatierte Prozeß des rascheren Glykogenabbaues im Vollblut nicht mehr störend in die Bestimmung der richtigen Relation hinein. (Vgl. dazu auch Versuch zu Abb. 3.)

Die Bestimmung geht nun weiter so vor sich, daß nach dem Zentrifugieren genaue Mengen reines Plasma und reine Erythrocyten separiert werden. Am Zentrifugierglas, das die 6 ccm homogene Blutlösung enthält, wird mit feiner Feile die Höhe der Erythrocytenschicht markiert und zur Volumkontrolle auch eine Marke am oberen Meniscus des Plasmas eingefeilt (s. Abb. 2).

Zu Abb. 2. Nachburettiert wird später mit Plasma-Citratgemisch. Da die Erythrocytenschicht keinen Meniskus bildet, sondern nach oben hin eben abschließt,

wird zur genauen Volumbestimmung das Zentrifugierglas mit pulverisiertem Quarz bis zur selben Höhe hart angestopft, 2,0 Plasma-Citratgemisch dazugegossen, markiert und dann nachbürettiert. Dieses „Anstopfen" erfolgt am besten durch Zentrifugieren einer Suspension von Quarz in Wasser. Ist der gewünschte Stand der festen Substanz erreicht, dann wird das überstehende Wasser abgesaugt.

Jetzt wird das Plasma zum größten Teil abpipettiert und daraus Proben für die Bestimmung des Plasmaglykogengehaltes entnommen.

Daß aus diesem überstehenden Plasma-Citratgemisch tatsächlich der richtige Glykogengehalt des unverdünnten Plasmas zu errechnen ist, wird durch Abb. 3 bewiesen.

In vivo glykogenangereichertes Kaninchenblut wird zu $^1/_5$ mit 3,8% Citratlösung versetzt; von der Mischung etwa 6 ccm in einem engen, möglichst langen Zentrifugierglas während 10 Minuten scharf zentrifugiert. Nach dieser Prozedur wird das Zentrifugierglas samt Inhalt unverändert 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Ablauf dieser Stunde werden von oben nach unten fortschreitend Plasmaproben abpipettiert und auf ihren Glykogengehalt untersucht.

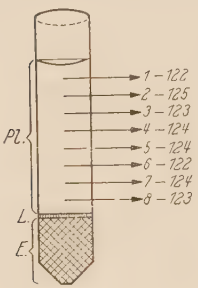


Abb. 3.

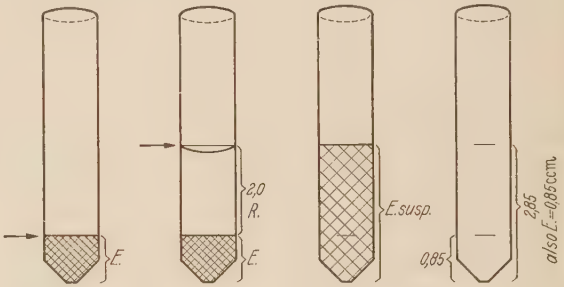


Abb. 4.

Der Versuch (Abb. 3) ergibt, daß das Citrat-Plasma nach dem Zentrifugieren eine homogene Glykogenlösung ist und daß der Abbau des Glykogens nicht schneller vor sich geht als wenn das Plasma allein stünde. (Sonst müßte doch wohl in Probe 8 weniger Glykogen zu finden sein als in Probe 1.)

Der überstehende Rest des Plasma wird nun abgesaugt, ebenso die ganze Leukocytenschicht und die oberste Schicht der Erythrocyten. Darauf wird von den Erythrocyten soviel als möglich abpipettiert. (Pipettenspitze am Boden des Zentrifugierglases, damit keine Plasma- oder Leukocytenreste nachfließen.) Die Pipette wird in ein schlankes Zentrifugierglas entleert. Das Zentrifugierglas wird etwa 5 Minuten zentrifugiert, 2,0 ccm Ringer dazugegeben, markiert und später nachbürettiert (s. Abb. 4).

Die Erythrocyten lassen sich mittels Glasstab (vermeide Schaumbildung) leicht homogen suspendieren. Von dieser Suspension werden Proben von 1,0 ccm entnommen.

Jetzt werden alle Proben zugleich (Vollblut, Plasma, Erythrocyten) mit 1,0 ccm 60%iger KOH versetzt, gekocht und das Glykogen nach üblicher Methode bestimmt*. Zur Bestimmung kommen bekannte

* 3,8%ige Citratlösung oder Ringerlösung geben, bei gleichem Vorgehen wie bei der Glykogenbestimmung, den Leerwert 0.

Mengen von Vollblut, Plasma und Erythrocyten. Die volumetrische Relation Pl./E. kann errechnet werden (s. Abb. 2); die Genauigkeit dieser Berechnung illustriert Tabelle 5. Dabei wurden je zwei beliebige Mengen verschiedener Blut-Citratgemische abzentrifugiert. Die wesentlichen Volumina nach Abb. 2 bestimmt und die Relation Pl./E. errechnet.

Tabelle 5. Die Relation Pl./E. desselben Blutes in zwei verschiedenen Zentrifugiergläsern bestimmt.

Prot.-Nr.	I Pl./E.	II Pl./E.
62	65/35	64/36
12/4 b	60/40	60/40
12/3 a	63/37	63/37
12/3 b	59/41	59/41

Berechnungsbeispiel (Prot.-Nr. 50).

2,5 ccm Citratlösung + Blut = 10,25 ccm; darin 4200 Leukocyten in cmm.
1,0 ccm der Vollblut-Citratmischung enthalten 3,65 mg% Glykogen.
1,0 ccm der Plasma-Citratmischung enthalten 1,00 mg% Glykogen.
1,0 ccm der Erthrocyten-Ringersuspension enthalten 2,90 mg% Glykogen.
$\frac{10,25}{7,75} = 1,32$ · Vollblut enthält $3,65 \cdot 1,32 = 4,82$ mg% Glykogen.
Effektive Leukocytenzahl pro cmm $= 4200 \cdot 1,32 = 5500$.
6,0 ccm Blut-Citratgemisch enthalten $\left(\frac{10,25}{7,75} = \frac{6,0}{x}\right) = 4,53$ ccm Blut.
Darin 1,60 Erythrocyten. Also 2,93 Plasma.
Verhältnis Pl./E. = 2,93/1,60 = 0,65/0,35.
Effektiver Plasmaglykogengehalt $= \left(\frac{4,40^*}{2,93} = \frac{x}{1,0}\right) = 1,50$ mg%.
Erythrocytenglykogengehalt $= \left(\frac{2,85}{0,85} = \frac{x}{2,9}\right) = 9,72$ mg%.
In 1,0 ccm Blut befinden sich $55 \cdot 10^5$ Leukocyten.

Ein Leukocyt hat ein durchschnittliches Volumen von 0,0000009 cmm (bei der Annahme durchschnittlicher Leukocytenzahlen von 60 % Granulierten, 30 % Lymphocyten, 10 % Monocyten und durchschnittlicher Durchmesser der Granulierten von 13 Mikren, der Monocyten von 16 Mikren und der Lymphocyten von 8 Mikren). Das Volumen der Gesamtleukocyten eines ccm Blut beträgt in diesem Falle etwa 5 cmm.

Da nun im Verhältnis Pl./E. im Plasma auch die Leukocyten miteingerechnet sind, muß die Menge Glykogen, die 5 cmm Plasma entspricht, vom Plasmagehalt eines ccm Vollblut abgezogen werden. Die Differenz, die entsteht, wenn man diesen korrigierten Plasmawert und den Wert für die Erythrocyten von dem Glykogengehalt eines ccm Vollblut abzieht, ergibt den Glykogengehalt der Leukocyten pro 1 ccm Vollblut.

Drei Beispiele solcher Berechnungen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Dabei entspricht Versuch Nr. 50 einem unbeeinflußten, normalen Kaninchenblut; Versuch Nr. 12 1 ist Blut eines Kaninchens, 3 Minuten nach einer

* 4,40 ist die Menge verdünnten Plasmas, die durch Subtraktion des Erythrocytenvolumens (6,0—1,60) erhalten wird.

intravenösen Injektion von 100 mg% Glykogen entnommen; Versuch Nr. 32 ist Blut eines mit Adrenalin vorbehandelten Kaninchens, 5 Minuten nach einer intravenösen Glykogeninjektion von 100 mg% entnommen.

Tabelle 6.

Prot.-Nr.	50	12/1	32
mg% Vollblut	4,82	65,60	39,78
mg% Plasma	1,50	92,40	42,53
mg% Erythrocyten	9,72	11,60	10,58
Verhältnis Pl./E. (in Vol.%)	65/35	67/33	76/24
1,0 ccm Vollblut enthält Glykogen in mg ($\cdot 10^{-4}$)	482	6560	3978
Leukocytenzahl in ccm ($\cdot 10^5$)	55	12	4
Leukocytenvolumen im ccm (in cmm)	5	1	0,3
entspricht an Plasma-Glykogengehalt in mg ($\cdot 10^{-4}$)	0,7	9	1,5
Bleibt: Glykogengehalt des in 1 ccm Vollblut befindlichen Plasma in mg ($\cdot 10^{-4}$)	97	6181	3231
Glykogengehalt der Erythrocyten in 1 ccm Vollblut in mg ($\cdot 10^{-4}$)	340	382	254
Differenz = Glykogengehalt der Leukocyten in 1 ccm Vollblut in mg ($\cdot 10^{-4}$)	45	0	493
1 Leukocyt enthält Glykogen in mg ($\cdot 10^{-9}$)	0,8	0	123,2
Prozentualer Anteil des Plasma	20	94	81
Prozentualer Anteil der Erythrocyten	71	6	6
Prozentualer Anteil der Leukocyten	9	0	12

Für alle folgenden Versuche sind die Berechnungen in der gleichen Weise wie in Versuch Nr. 50 und Tabelle 6 ausgeführt. Zur besseren Übersicht sind aber jeweils nur die wesentlichen Resultate angeführt.

Kurze Diskussion der Methodik.

Um eine hinreichende Genauigkeit der Methode zu erzielen, sind in erster Linie folgende Punkte zu beachten:

1. Gutes Mischen der Proben. (Die Kontrollen müssen genau übereinstimmen.)

2. Schnelles Arbeiten, damit möglichst wenig Glykogen abgebaut wird. Von der Entnahme des Blutes bis zum Versetzen mit KOH benötigten wir immer eine Stunde. Die Zeit muß eingehalten werden, damit bei erhöhten Glykogenwerten die Resultate verschiedener Versuche verglichen werden können. In Versuchen mit normalem Blut-Glykogengehalt sind die Werte wohl absolut (vgl. Tabelle 1).

3. Möglichst große Mengen von Blut oder Blutbestandteilen vorlegen, damit eine große Genauigkeit erhalten wird.

4. Immer in der gleichen KOH-Konzentration und gleich lang, d. h. 1 Stunde, kochen.

Der Glykogengehalt des Vollblutes, des Plasma und der Erythrocyten wird gesondert direkt bestimmt. Das Volumenverhältnis Pl./E., das ebenfalls direkt gemessen wird, gestattet den Glykogengehalt der Leukocyten als Differenz indirekt zu errechnen. Der Versuch, den Glykogengehalt der Leukocyten ebenfalls direkt zu bestimmen, gelingt wohl bei Leukocytenzahlen von etwa 5000 und mehr pro cmm. Dagegen läßt sich bei Leukocytenzahlen von 1000 oder weniger, wie sie im Verlauf der Versuche vorkommen, nach dem Zentrifugieren eine sogenannte „Schicht" der Leukocyten nicht gesondert entnehmen. Um in beiden Fällen unter den gleichen Bedingungen zu arbeiten, wurde immer die indirekte Bestimmung angewandt. Wenn dann z. B. in Tabelle 6 ein Leukocyt des Versuchs Prot. Nr. 12 1 kein Glykogen enthält und ein Leukocyt des Versuchs Prot. Nr. 32 enthält 123,2 ($\cdot 10^{-9}$) mg, so gibt dieses Resultat den gewünschten Aufschluß, nämlich daß die Leukocyten des letzten Versuchs mehr Glykogen enthalten. In den folgenden Versuchen werden, was den Leukocytenglykogengehalt betrifft, nur wesentliche Unterschiede berücksichtigt, um anzunehmen, daß im einen Falle mehr, im anderen weniger Glykogen in den Leukocyten vorhanden ist.

Da Blut allein zugeführtes Glykogen rasch abbaut (s. Tabelle 2 und 3), kann man im glykogenangereicherten Blut keine absoluten Glykogenwerte bestimmen, weil während der Vorbereitungen zur Bestimmung fortwährend Glykogen verschwindet. Wesentlich ist, daß die relativen Glykogenwerte, trotz des fortwährenden Abbaues von Glykogen, richtig sind, dann kann auch der Glykogengehalt der Leukocyten als Differenz errechnet werden. Die Relation der Glykogenwerte der einzelnen Blutbestandteile entspricht aber der ursprünglichen im Blut vorhandenen, wenn

a) die Proben für die Bestimmung des Vollblutes zuerst entnommen und mit der Menge, die der Gewinnung von Plasma und Erythrocyten dient, zugleich zentrifugiert werden,

b) alle Proben desselben Blutes zu gleicher Zeit mit KOH versetzt und gleich lang gekocht werden.

II. Teil. Ergebnisse.

A. In einer ersten Versuchsreihe sind mit der beschriebenen Methode im Blut nüchterner, unbeeinflußter Kaninchen die prozentualen Anteile des Plasma, der Erythrocyten und der Leukocyten am Gesamtglykogengehalt des Blutes bestimmt (vgl. Tabelle 7).

Die Befunde bestätigen die frühere Feststellung von Staub und Golandas (5), daß der Großteil des Glykogens im unbeeinflußten Kaninchenblut in den Formelementen nachzuweisen ist (vgl. Tabelle 7). Am meisten Glykogen enthalten die Erythrocyten, deren Glykogengehalt

Tabelle 7. Glykogenverteilung im normalen Kaninchenblut.

Prot.-Nr.	Vom Gesamt-Glykogen im Vollblut sind in % enthalten in:			Leukocytenzahl im cmm	1 Leukocyt enthält Glykogen in mg (· 10^{-9})
	Plasma	Erythrocyten	Leukocyten		
53	13	51	36	6600	2,8
50	20	71	9	5500	0,8
62	39	61	0	6100	0
57	34	66	0	8900	0
61	40	60	0	6000	0
32	23	77	0	7000	0
1	14	83	3	3200	0,6
45	23	77	0	4400	0
19	25	75	0	3700	0
12/1	16	84	0	3600	0
12/4	16	84	0	5300	0
12/3	20	70	10	5900	0,7
5	30	70	0	2000	0
4/b	15	64	21	4800	2,2
2/a	24	76	0	2500	0
2/a	17	83	0	2500	0
D =	23 %	72 %	5 %	4800	0,4

Durchschnittlicher Glykogengehalt pro 100 ccm Erythrocyten = 10,16 mg.

in den angeführten Beispielen nur wenig um einen Durchschnittswert von 10,16 mg% schwankt (10,16 mg pro 100 ccm Erythrocyten). Die Leukocyten des unbeeinflußten Kaninchenblutes sind meist glykogenfrei.

Nach diesen Ergebnissen ist der Schluß gestattet, daß individuelle Unterschiede im Blutglykogengehalt vorwiegend auf Änderungen im Glykogengehalt des Plasma und der Leukocyten zurückzuführen sind, da ja der Erythrocytenglykogengehalt die erwähnte, auffallende Konstanz zeigt.

B. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Glykogenverteilung auf die einzelnen Blutbestandteile bestimmt, nach Anreicherung des Blutes in vitro mit Glykogen. Normalen, nüchternen Kaninchen wurde Blut entnommen und mit $^1/_5$ Vol. Citratlösung versetzt. Von dieser Blut-Citratlösung wurden je eine Kontrollprobe a und eine glykogenangereicherte Probe b 10 Minuten unter öfterem Umrühren stehengelassen und nachher in üblicher Weise die Glykogenverteilung bestimmt. Das in B zugesetzte Glykogen ist in der Tabelle 8 in mg% angegeben. Die Resultate sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Die Leukocyten des unbeeinflußten Kaninchenblutes zeigen keine Tendenz in vitro zugeführtes Glykogen aufzunehmen; die geringgradige Erhöhung des Glykogengehaltes des einzelnen Leukocyten ist nicht signifikant. Eine elektive Anreicherung von Glykogen in den Leukocyten hat nicht stattgefunden, sonst wäre der prozentuale Anteil der Leukocyten am Gesamtglykogengehalt gegenüber den normalen Kontrollen zumindest

Tabelle 8. Glykogenverteilung im Kaninchenblut nach Glykogenanreicherung in vitro.

Prot.-Nr.	Zugesetztes Glykogen in mg%	Vom Gesamtglykogengehalt im Vollblut sind in % enthalten in:			Leukocytenzahl im cmm	1 Leukocyt enthält Glykogen in mg ($\cdot 10^{-9}$)
		Plasma	Erythrocyten	Leukocyten		
		a) Normale Kontrollen.				
62	0	39	61	0	6100	0
12/4	0	16	84	0	5300	0
12/4	0	36	64	0	1400	0
12/3	0	20	70	10	5900	0,7
D =		27,5	70	2,5	4700	0,18
		b) Glykogenangereichertes Blut.				
62	75	78	20	2	6100	1,0
12/4	20	45	50	5	5300	0,6
12/4	20	60	40	0	1400	0
12/3	100	80	20	0	5900	0
D =		66	32	1,8	4700	0,4

Durchschnittlicher Gehalt der Erythrocyten von b = 11,42 mg%.

nicht gesunken. Wenn das zugeführte Glykogen eine besondere Affinität zu den Leukocyten hätte, müßte ferner erwartet werden, daß im Versuch mit höchster Glykogenkonzentration auch am meisten Glykogen in den Leukocyten sich findet, das ist aber nicht der Fall. Auffällig ist der geringe Anstieg des Erythrocytenglykogengehaltes.

Aus den Versuchsresultaten ist zu schließen, daß in vitro glykogenangereichertes Kaninchenblut das zugeführte Glykogen fast ausschließlich im Plasma enthält; deshalb nimmt mit steigendem Glykogengehalt des Vollblutes der prozentuale Plasmaanteil zu.

C. Die folgende Versuchsreihe gibt Aufschluß über die Verteilung des Glykogens auf die einzelnen Blutbestandteile nach Anreicherung des Blutes in vivo mit Glykogen.

Nüchternen Kaninchen werden verschiedene Mengen Glykogen intravenös zugeführt. Die injizierte Glykogenmenge wird in mg% angegeben, berechnet auf eine Gesamtblutmenge von $^1/_{13}$ des Körpergewichtes. In früheren Versuchen haben wir gefunden, daß etwa 3 Minuten nach Glykogeninjektion der Leukocytentiefstand erreicht ist, deshalb wird meist 3 Minuten, einigemal 5 Minuten nach der Injektion Blut aus der Ohrvene zur Bestimmung der Glykogenverteilung entnommen. Gleiche Versuche sind auch an zwei eviszerierten Tieren vorgenommen (s. Prot.-Nr. 1 und 5 in Tabelle 9).

Tabelle 9 zeigt, daß diejenigen Leukocyten, die nach der intravenösen Glykogenzufuhr im peripheren Leukocytentiefstand noch im zirkulierenden Blut vorhanden sind (vorwiegend Lymphocyten), kein Glykogen aufgenommen haben. Bei dem stark erhöhten Glykogengehalt des Vollblutes

Tabelle 9. Glykogenverteilung im Kaninchenblut nach Glykogenanreicherung in vivo.

Prot.-Nr.	Zugeführtes Glykogen in mg%	Glykogenverteilung in % auf:			Leukocytenzahl		1 Leukocyt enthält Glykogen in mg (· 10^{-9})
		Plasma	Erythrocyten	Leukocyten	Vor Glykogeninjektion	Bei der Entnahme	
12/4	20	36	64	0	5300	1400	0
12/3	100	83	17	0	5900	1500	0
4/b	100	71	19	10	4800	800	27,0
2/b	100	87	13	0	11900	1300	0,5
2/b	100	77	23	0	11900	1300	0
45	100	86	14	0	4400	1100	0
48	100	84	16	0	?	2200	0
19	30	46	54	0	3700	2400	0
12/1	100	94	6	0	3600	1200	0
D =		74	25	1	6400	1400	3,0
		Total eviszerierte Tiere.					
1	120	93	6,5	0,5	3200	1800	2,8
5	100	85	15	0	2000	500	0,6

Glykogengehalt der Erythrocyten pro 100 ccm Erythrocyten = 11,19 mg.

ist der prozentuale Anteil der Leukocyten am Glykogen stark gesunken (Versuchs-Prot. Nr. 4/b ist nur ein scheinbarer Ausfall; vgl. Normalwert von 4/b in Tabelle 7). Auch bei eviszerierten Tieren ist der Effekt derselbe (vgl. die zugehörigen Normalwerte in Tabelle 7).

Die nach intravenöser Glykogenzufuhr im Stadium der peripheren Leukopenie noch im zirkulierenden Blut vorhandenen weißen Blutkörperchen haben sich nicht mit Glykogen beladen.

Wiederum fällt der geringe Anstieg des Erythrocytenglykogengehaltes auf; der prozentuale Plasmaanteil muß deshalb mit steigendem Glykogengehalt des Vollblutes ansteigen.

Die Befunde in Tabelle 9 stützen unsere Annahme, daß die Leukocyten (in erster Linie die granulierten Formen) nach intravenöser Glykogenzufuhr vorübergehend in der Lunge retiniert werden, wahrscheinlich eben deshalb, weil sie sich mit Glykogen beladen haben. Die Versuche an eviszerierten Tieren sind besonders beweiskräftig. Andererseits bleiben Leukocyten (vorwiegend Lymphocyten), die sich nicht mit Makromolekeln beladen haben, auch nicht in den Lungenkapillaren stecken.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen Leukopenie und Glykogentransport durch die Leukocyten ist auch dann wahrscheinlich, wenn eine gewisse Proportionalität zwischen dem Verschwinden der Leukocyten und dem Verschwinden des Glykogens aus dem peripheren Blut nachgewiesen werden kann, wie sie der Versuch in Abb. 5 zeigt.

Ferner wurde untersucht, ob nicht in einem bestimmten Zeitpunkt nach der Glykogenzufuhr Leukocyten im zirku-

lierenden Blut zu finden sind, die tatsächlich Glykogen gespeichert haben. Da es etwa 3 Minuten dauert, bis der Leukocytentiefstand erreicht ist — d. h. ein Vielfaches der Blutumlaufszeit —, besteht die Möglichkeit, eventuell während dieser ersten 3 Minuten glykogenangereicherte Leukocyten im zirkulierenden Blut zu finden.

Einem Kaninchen wurden deshalb 30 mg% Glykogen i.v. gegeben und vorher und 1, 2 und 3 Minuten nach der Injektion die Glykogenverteilung verfolgt. (Es wurden nur 30 mg% Glykogen injiziert, um eine eventuelle Glykogenanreicherung in den Leukocyten um so deutlicher nachweisen zu können, wenn der Plasmaglykogengehalt niedrig ist.)

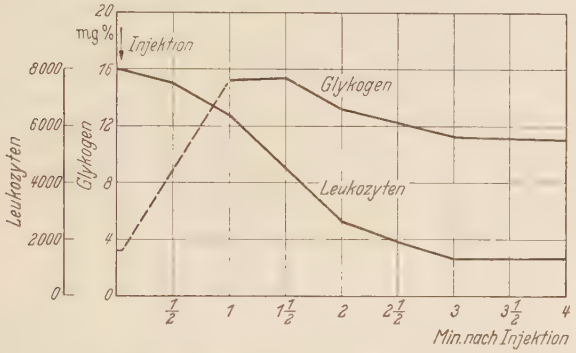


Abb. 5. Verlauf von Glykogenämie und Leukocytose nach 20 mg% Glykogen intravenös. Kurve G = Glykogengehalt im Gesamtblut. Kurve L = periphere Leukocytenzahl.

Tabelle 10. Glykogenverteilung und Leukocytose innerhalb der ersten 3 Minuten nach i. v. Glykogenzufuhr.

Prot.-Nr.	Blutentnahme nach der Injektion in Min.	Glykogengehalt in mg%		Prozentuale Verteilung von Glykogen auf:			Leukocytenzahl im cmm	1 Leukocyt enthält Glykogen in mg ($\cdot 10^{-9}$)
		Vollblut	Erythrocyten	Plasma	Erythrocyten	Leukocyten		
19	vor	3,94	8,20	25	75	0	3700	0
	1	6,20	8,17	62	38	0	3000	0
	2	5,73	8,17	58	42	0	2900	0
	3	5,24	9,00	46	54	0	2400	0

In Tabelle 10, Kaninchen Nr. 19, sind die Versuchsresultate zusammengestellt. Das wesentliche Resultat ist, daß die Leukocyten, die allmählich an Zahl abnehmen, keineswegs eine Glykogenanreicherung zeigen, sondern auch während dieser ersten 3 Minuten stets glykogenarm sind. Die weitgehende Konstanz des Erythrocytenglykogengehaltes ist auch in diesem Versuch zu sehen.

Aus früheren Versuchen haben wir geschlossen, daß die mit Glykogen beladenen Leukocyten vorübergehend in der Lunge steckenbleiben und nachher, nachdem sie ihr Glykogen ganz oder teilweise abgegeben haben,

wieder ins zirkulierende Blut zurückkehren. Die Rückkehr dieser Leukocyten setzt offenbar ein, wenn der Leukocytentiefpunkt überschritten ist. Zuerst wird allerdings der reaktive Nachschub aus dem Knochenmark die Leukocytenzahl im peripheren Blut wieder erhöhen und wahrscheinlich erst in späterem Zeitpunkt werden sich auch die aus der Lunge zurückkehrenden Leukocyten wieder im peripheren Blut zeigen. In den folgenden Versuchen (s. Tabelle 11) wurde die Glykogenverteilung im Stadium des Wiederanstieges der Leukocyten, d. h. 12—60 Minuten nach Glykogeninjektion von je 100 mg% (in Versuch Nr. 19 nur 30 mg%) untersucht. Wir vermuteten, daß aus der Lunge wieder zurückkehrende Leukocyten eventuell noch glykogenreich sein könnten.

Tabelle 11. Glykogenverteilung im Kaninchenblut im Stadium des Wiederanstiegs der Leukocytenzahl.

Prot.-Nr.	Blutentnahme nach der Injektion in Min.	Vollblut-Glykogen in mg%	Glykogenverteilung in % auf:			Leukocytenzahl		1 Leukocyt enthält Glykogen in mg ($\cdot 10^{-9}$)
			Plasma	Erythrocyten	Leukocyten	Vor der Glykogeninjektion	Bei der 2. Blutentnahme	
50	30	11,04	72	28	0	5500	3300	0
45	12	23,10	85	15	0	4400	2500	0
45	60	6,30	44	56	0	4400	2800	0
19	30	3,90	46	54	0	3700	2400	0
12/1	30	11,60	75	25	0	3600	2700	0
12/1	60	6,50	59	41	0	3600	3800	0
5	15	24,60	85	15	0	2000	700	0
5	30	19,00	84	16	0	2000	4100	0

Durchschnittlicher Gehalt der Erythrocyten pro 100 ccm Erythrocyten = 9,71 mg.

Die in Tabelle 11 zusammengestellten Versuche zeigen aber, daß die Leukocyten auch im Stadium des Wiederanstieges glykogenarm sind. Wenn in diesem Stadium überhaupt schon Leukocyten, die vorübergehend in der Lunge retiniert waren, im zirkulierenden Blut vorhanden sind, so weist das Versuchsresultat darauf hin, daß sie ihr Glykogen in der Lunge vollständig abgegeben haben.

Die Versuche in Tabelle 11 lassen wieder den ziemlich konstanten Erythrocytenglykogengehalt erkennen. Je länger das Intervall zwischen Glykogeninjektion und Blutentnahme ist, um so stärker steigt der prozentuale Anteil des Erythrocytenglykogens am Gesamtblutglykogen wieder an.

D. In allen vorausgehenden hier mitgeteilten Versuchen ist es nie gelungen, glykogenangereicherte Leukocyten im zirkulierenden Blut zu bestimmen. Ein direkter Beweis, daß die Leukocyten sich mit Glykogen beladen und Transportfunktion für die Makromoleküle übernehmen, fehlt demnach. Wir können vermuten, daß die mit Glykogen beladenen Leukocyten bei der ersten Lungenpassage steckenbleiben und deshalb keine

solchen glykogenhaltigen weißen Blutkörperchen im zirkulierenden venösen Blut nachweisbar sind.

Die vorstehenden Versuchsprotokolle lassen auch ersehen, daß in der Regel auch dann keine glykogenangereicherten Leukocyten im peripheren Blut nachweisbar sind, wenn nach der Glykogeninjektion der Glykogengehalt im Plasma noch hoch ist und noch 1000 und mehr Leukocyten im mm^3 Blut zirkulieren (vgl. Tabelle 9 und 11). Wenn trotz erhöhtem Glykogengehalt des Plasma nicht alle Leukocyten im zirkulierenden Blut sich mit Glykogen beladen und vorübergehend in der Lunge verschwinden, so ist anzunehmen, daß nicht alle Leukocyten in gleichem Maße die Fähigkeit besitzen, Glykogen aufzunehmen oder zu adsorbieren. Daß die Granulocyten offenbar rascher Glykogen aufnehmen als die Lymphocyten, geht aus unseren früheren Versuchen hervor, in denen gezeigt wurde, daß nach Glykogenzufuhr in erster Linie die Granulocyten und weniger ausgesprochen die Lymphocyten verschwinden [vgl. Staub, Mezey und Golandas (1) und Bucher (3)]. 3 Minuten nach einer intravenösen Injektion von 100 mg% Glykogen ist nach der Tabelle 2 in der Arbeit von Bucher (3) der Granulocytengehalt des Blutes praktisch Null; die Lymphocytenzahlen sind absolut ebenfalls zurückgegangen, aber nur bis auf $^1/_3$—$^1/_{10}$ des Ausgangswertes; die noch zirkulierenden Lymphocyten sind aber nicht glykogenangereichert.

In den Versuchen in Tabelle 11 hat sich ferner gezeigt, daß auch dann, wenn die Leukocytenzahl 12—60 Minuten nach der Glykogeninjektion wieder zu steigen beginnt, diese Leukocyten, trotz noch erhöhtem Glykogengehalt des Plasma, das Glykogen nicht aufnehmen. Wir haben früher nachgewiesen, daß bei der Wiederherstellung der normalen Leukocytenzahl, nach der Glykogenleukopenie, eine Linksverschiebung im Granulocytenbild auftritt. Diese Reaktion deuteten wir als eine reaktive Abgabe von weißen Zellen aus dem Knochenmark. Wenn diese Leukocyten kein Glykogen aus dem Plasma anreichern, so ist eventuell der Schluß erlaubt, daß junge Granulocyten die Fähigkeit, Makromoleküle zu phagocytieren oder zu adsorbieren, noch nicht oder nur in geringerem Maße besitzen.

Um nun eventuell doch glykogenreiche Leukocyten im zirkulierenden Blut nachweisen zu können, haben wir eine subcutane Adrenalininjektion mit der intravenösen Glykogenapplikation kombiniert. Wir stellten uns vor, daß beim zeitlichen Zusammenfallen von Adrenalingranulocytose mit Glykogenleukopenie vielleicht nicht alle reifen Granulocyten aus dem peripheren Blut verschwinden und dann glykogenangereicherte Granulocyten nachweisbar würden.

Adrenalinversuche.

Nüchterne Kaninchen erhalten 1,0 ccm $1^0/_{00}$ige Adrenalin-hydrochloridlösung subcutan. Nach 27 Minuten wird 100 mg% Glykogen intravenös verabreicht; 3 Minuten später Blut entnommen. Leukocyten-

Tabelle 12. Kombinierte Adrenalin-Glykogenversuche.

Prot.-Nr.	Glykogenverteilung in % auf:			Leukocytenzahl		1 Leukocyt enthält Glykogen in mg (· 10^{-9})
	Plasma	Erythrocyten	Leukocyten	27 Min.	30 Min.	
3	77	12	11	18800	11500	3,5
32	82	6	12	9900	400	123,2
1	90	5	5	11000	10300	5,8
D	83	8	9	13000	7000	44,0

zahlen sind unmittelbar vor der Glykogeninjektion und bei der Blutentnahme bestimmt.

Aus der Tabelle 12 geht hervor, daß nach Adrenalin- und Glykogenzufuhr tatsächlich mit Glykogen beladene Leukocyten im zirkulierenden, venösen Blut auftreten. Dieser Befund spricht aber nicht mit Sicherheit dafür, daß unter dem Einfluß von Adrenalin nun tatsächlich Leukocyten im strömenden Blut sich mit dem injizierten Glykogen beladen hätten. Wir haben vielmehr als wahrscheinlich anzunehmen, daß unter Adrenalinwirkung glykogenangereicherte Granulocyten aus der Leber in das zirkulierende Blut gelangt sind. Eine solche Auffassung ist durch frühere Versuche von Staub und Golandas (6) belegt, in denen nach Adrenalingaben allein eine Glykogenanreicherung in den Formelementen des Blutes gefunden wurde.

In einer weiteren Versuchsreihe haben wir einer Erstinjektion von Glykogen einige Minuten später eine zweite folgen lassen, weil wir vermuteten, daß die Leukocyten, die nach der ersten Glykogeninjektion aus der Lunge wieder in Zirkulation gelangen, sich eventuell mit dem Glykogen der zweiten Dosis beladen könnten und im zirkulierenden Blut nachweisbar würden.

Versuche mit zweimaliger Glykogeninjektion.

Nüchternen Kaninchen wird eine bestimmte Menge Glykogen injiziert (Erstinjektion). Nach einigen Minuten wird eine zweite intravenöse Injektion von 100 mg% Glykogen verabreicht (Superinjektion). Einige Minuten nach der Superinjektion wird Blut zur Glykogenbestimmung entnommen.

Die Versuche in Tabelle 13 geben in der Mehrzahl der Fälle einen erhöhten prozentualen Anteil der Leukocyten am Glykogengehalt des Vollblutes; die einzelnen Leukocyten sind glykogenangereichert.

In drei von den vier Versuchen der Tabelle 13 ist auf die zweite Glykogeninjektion die Leukocytenzahl entweder nicht mehr auffällig gesunken (Versuch Nr. 50) oder angestiegen (Versuch Nr. 45 und 48). Im Versuch Nr. 1 ist dagegen auf die Superinjektion die periphere Leukocytenzahl noch weiter eindeutig abgefallen. Es ist nun zu ersehen, daß in den drei Versuchen, in denen die zweite Glykogeninjektion keinen

Tabelle 13. Versuche mit zweimaliger Glykogeninjektion.

	Prot.-Nr.	Zeit in Min.	Glykogen in mg%	Leukocytenzahl pro cmm	Glykogenverteilung in % auf: Plasma	Erythrocyten	Leukocyten	1 Leukocyt enthält Glykogen in mg (· 10^{-9})
	50	0		5500				
Erstinjektion →			30					
		10		1300				
Superinjektion →			100					
		13		1200	85	8	7	27,3
	1	0		3200				
Erstinjektion →			100					
		4		1800				
Superinjektion			100					
		12		1200	71	29	0	0
	45	0		4400				
Erstinjektion →			100					
		8		800				
Superinjektion →			100					
		12		2300	83	8	9	28,5
	48	0		5800				
Erstinjektion →			100					
		4		2200				
Superinjektion →			100					
		8		3000	88	7	5	11,0
			Durchschnitt:		82	13	5	16,7

weiteren Leukocytensturz oder einen Leukocytenanstieg hervorrief, auch eine Glykogenanreicherung der weißen Blutkörperchen eintritt. Die Glykogen-Leukocytenreaktion ist also durch die Doppelbelastung mit Glykogen irgendwie verändert worden.

Zur Erklärung sind die anderen Versuchsergebnisse beizuziehen. Wir haben in den Versuchen in Tabelle 11 (S. 520) zeigen können, daß die Leukocyten auch dann nicht glykogenangereichert sind, wenn die Leukocytenzahl nach dem Tiefpunkt der Glykogenleukopenie wieder zu steigen beginnt. Da der Wiederanstieg der Leukocyten in erster Linie durch Nachlieferung von Leukocyten aus dem Knochenmark (Linksverschiebung), in zweiter Linie durch die weißen Blutkörperchen, die aus der Lunge wieder in das zirkulierende Blut zurückkehren, hervorgerufen wird, können wir schließen, daß weder die jungen Granulocyten aus dem Knochenmark, noch die ursprünglich im zirkulierenden Blut vorhandenen Leukocyten sich im peripheren Blute mit Glykogen anreichern. Die einzige Versuchsanordnung, die uns sonst noch bis jetzt glykogenangereicherte Leukocyten im peripheren Blute ergab, waren die Adrenalininjektionen (vgl. Tabelle 12, S. 522). Wir haben angenommen, daß diese glykogenangereicherten Leukocyten unter der Adrenalinwirkung aus der Leber in das zirkulierende Blut gelangen. Vielleicht spielt beim Auftreten

von glykogenbeladenen Leukocyten im peripheren Blute nach Doppelbelastung mit Glykogen auch eine Adrenalin-Leberfunktion mit. Wir werden diesem Phänomen weitere Beachtung schenken, weil die Möglichkeit einer Inkretkorrelation durchaus besteht.

Besprechung der Ergebnisse.

In Tabelle 14 sind die gefundenen Durchschnittsresultate übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle 14.

	Glykogenverteilung in % auf:			1 Leukocyt enthält Glykogen in mg (· 10⁻⁹)	Glykogengehalt der Erythrocyten pro 100 ccm Erythrocyten in mg %
	Plasma	Erythrocyten	Leukocyten		
Normalwerte	23	72	5	0,4	10,16
Glykogenzugaben in vitro	66	32	1,8	0,4	11,42
Befunde nach intravenösen Glykogeninjektionen.					
Im Zeitpunkt des peripheren Leukocytentiefstandes	74	25	1	3,0	11,19
Nach Adrenalinvorbehandlung	83	8	9	44,0	
Während und nach Leukocytenwiederanstieg im peripheren Blut			0	0	9,71
Nach 2. Glykogeninjektion	82	13	5	16,7	

Ein Hauptziel der vorliegenden Untersuchungen war, in vitro oder in vivo glykogenbeladene Leukocyten nachzuweisen. Wir wollten damit beweisen, daß den weißen Blutkörperchen Transportfunktion für Makromoleküle zukommt. Nach unserer bisherigen Auffassung sollten sich die Leukocyten im peripheren, strömenden Blut mit dem intravenös applizierten Glykogen beladen und dann infolge Volumenzunahme oder Versteifung des Leukocytenplasma und damit geringerer Flexibilität der Zelle in den Lungenkapillaren steckenbleiben (Staub). Es ist uns aber durch die verschiedensten Versuchsanordnungen bis jetzt nicht gelungen, weder in vitro noch in vivo die weißen Blutkörperchen an Glykogen anzureichern; einzig Adrenalin und eine zweite Injektion von Glykogen führten zum Auftreten von glykogenbeladenen Leukocyten.

Auf Grund dieser Versuchsresultate ist unsere bisherige Theorie abzuändern. Wir haben jetzt anzunehmen, daß die in Form von Glykogen intravenös applizierten Makromoleküle im Blutplasma zur Lunge transportiert werden und dort die Strömungsverhältnisse dahin verändern, daß die Leukocyten in der Reihenfolge des größeren zum kleineren Zellvolumen steckenbleiben.

Wir haben uns weiter vorzustellen, daß die Leukocyten, soweit sie nicht in der Lunge selbst zerfallen, wieder in das periphere zirkulierende Blut zurückkehren, wenn unter der Wirkung der Fermente im Lungengewebe oder der Fermente der steckengebliebenen Leukocyten die Makromoleküle abgebaut und verkleinert sind.

Die Leukopenie nach Injektion von Makromolekülen wäre nach dieser Auffassung eine sekundäre, durch die primäre Veränderung der Strömungsverhältnisse in den Lungenkapillaren durch die Glykogenapplikation bedingte Erscheinung. Diese mechanisch hervorgerufene Retention der weißen Blutkörperchen in der Lunge bedingt dann offenbar auch noch einen rascheren Abbau der Makromoleküle durch leucocyteneigene Fermente.

Wenn, wie Staub und Golandas (5) schon festgestellt hatten, nach Adrenalin eine Glykogenämie auftritt, und dieses Glykogen nach den vorliegenden Versuchen im strömenden Blut sich in den Leukocyten findet, so müßten wir in diesem Falle wohl einen anderen Mechanismus der Glykogenanreicherung in den weißen Blutkörperchen annehmen. Es ist dabei an die Möglichkeit zu denken, daß die glykogenangereicherten Leukocyten aus der Leber stammen und dort beladen werden. In diesem Spezialfall hätten wir tatsächlich eine Transportfunktion der Leukocyten anzunehmen, die mit der Adrenalinleukocytose zusammen auch quantitativ recht wirksam wäre. Die glykogenhaltigen Leukocyten im zirkulierenden Blute kämen also nach dieser Auffassung aus der Leber, und für die glykogenangereicherten Leukocyten im peripheren Blute nach Doppelbelastung mit Glykogen dürfte ein ähnlicher Mechanismus in Frage kommen.

Die Leukocytose nach wiederholter Glykogenzufuhr ist ein Additionseffekt der überschießenden Reaktion des Knochenmarkes (Linksverschiebung) — aus der Lunge zurückkehrenden Leukocyten + Leukocyten aus anderen Blutdepots (glykogenangereichert).

Wir werden in weiteren Untersuchungen festzustellen haben, ob die Intensität der Leukopenie von der Größe der Makromoleküle abhängt und ob die Retention der Leukocyten in den Lungenkapillaren pharmakologisch beeinflußbar ist.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode angegeben, die erlaubt, den Glykogengehalt von Plasma, Erythrocyten, Leukocyten und deren Anteil am Glykogengehalt des Vollblutes zu bestimmen. Die Versuche sind durchwegs an Kaninchen ausgeführt.

2. Die Leukocyten des unbeeinflußten Blutes sind meist glykogenfrei. Der Großteil des Blutglykogens ist an die Erythrocyten gebunden; ihr Glykogengehalt ist bei den verschiedenen Tieren annähernd konstant. Der Glykogengehalt des Plasmas ist normalerweise niedrig.

3. Kaninchenblut hat die Fähigkeit, in vitro oder in vivo zugesetztes Glykogen abzubauen.

4. In vitro zu Blut zugesetztes Glykogen bleibt im Plasma, eine nennenswerte Anreicherung in Leukocyten oder Erythrocyten konnte nicht gefunden werden.

5. Unterschiede im Blutglykogengehalt im Normalzustande oder unter bestimmten experimentellen Bedingungen sind auf Änderungen im Glykogengehalt des Plasmas oder der weißen Blutkörperchen zurückzuführen, da der Glykogengehalt der Erythrocyten eine weitgehende Konstanz aufweist.

6. Nach Adrenalin sind im zirkulierenden Blute glykogenangereicherte Leukocyten nachweisbar.

7. Nach zweimaliger intravenöser Glykogenzufuhr sind im zirkulierenden Blute ebenfalls mit Glykogen beladene Leukocyten zu finden.

8. Es wird eine Theorie entwickelt, nach der die primäre Ursache der Glykogenleukopenie oder allgemein der Leukopenie nach intravenöser Applikation blutfremder Makromoleküle, in einer Erschwerung oder Verlangsamung des Blutstromes in den Lungenkapillaren zu suchen ist. Sekundär bleiben dann offenbar die Leukocyten in der Reihenfolge der Größe ihres Durchmessers in der Lunge vorübergehend stecken. Eine Transportfunktion der Leukocyten ist unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen.

Für das Auftreten von glykogenbeladenen Leukocyten nach Adrenalin oder Doppelinjektion von Glykogen ist ursächlich eine Transportfunktion der Leukocyten möglich; die Leukocyten beladen sich in diesen Fällen vielleicht in der Leber.

Literatur.

1) Staub, Mezey u. Golandas: Klin. Wschr. **43**, 1501 (1938). — 2) Staub u. Bucher: Ebenda **44**, 1555 (1938). — 3) Bucher: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 587 (1939). — 4) Golandas: Pflügers Arch. **236**, 230 (1935). — 5) Staub u. Golandas: Ebenda **236**, 355 (1935). — 6) Staub u. Golandas: Schweiz. med. Wschr. **33**, 969 (1938).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik zu Kiel.
(Direktor: Prof. Dr. Hanns Löhr.)

Über die pharmakologische Beeinflussung des galvanischen Hautreflexes*.

Von

K. W. Essen und **Kurt Rogge.**

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Januar 1940.)

In der Behandlung der Störungen des vegetativen Nervensystems (v.N.S.), die sich in Schwitzen, Kopfdruck, Schwindel, Abgeschlagenheit, Herzklopfen, Magen-Darmstörungen usw. zu äußern pflegen, spielen die dämpfenden Medikamente die Hauptrolle. Ihre Anwendung leitet sich von der Annahme her, daß Vagus und Sympathicus übererregt seien, und daß dadurch die autonom innervierten Organe sich in einem Zustand von Über- oder Dysfunktion befänden, was den Anlaß zu den eingangs angedeuteten Beschwerden abgeben soll. Der eine von uns (Essen 1938) hat darauf hingewiesen, daß man weder aus der mehr oder weniger dauernden Veränderung der Tätigkeit eines autonom gesteuerten Organs sichere Rückschlüsse auf den Neurotonus ziehen darf, noch daß Änderungen z. B. der Herzfrequenz nach Atropingabe ein zuverlässiges Maß für den Vago- bzw. Sympathicotonus sind. Damit sind aber die Beobachtungen, die immer eine Übererregbarkeit des v.N.S. als Ursache der vegetativen Störungen ansehen und die die Übererregbarkeit des Sympathicus z. B. aus einer Tachycardie oder weiter Pupille, die Vagotonie aus einer Bradycardie erschließen, in ihrer Bedeutung herabgemindert.

Hinzu kommt, daß man auch von anatomischer Seite die antagonistische Doppelinnervation aller autonom innervierten Organe anzweifelt (Stöhr, Reiser, Sunder-Plassmann), und daß nach den Ergebnissen der Sympathicuschirurgie die peripheren Abschnitte des v.N.S. weitgehend selbständig arbeiten können (Braeucker).

Diese Erkenntnisse veranlaßten uns, das Wesen des vegetativen Syndroms nicht mehr in einer Übererregbarkeit im Vagus und Sympathicus zu suchen. Wir schlossen uns vielmehr v. Bergmann an, indem wir den Ablauf einer autonomen Reaktion bei Gesunden und vegetativ Gestörten nach physiologischer Reizung miteinander verglichen und auf diese Ergebnisse unsere Behandlung gründeten.

Wie in mehreren Arbeiten berichtet, leistete uns der sogenannte galvanische Hautreflex (g.H.R.), der nach Gildemeister Teilerscheinung

* D. S.

einer allgemeinen autonomen Reaktion ist und auf einer reflektorischen Permeabilitätsänderung der Schweißdrüsenzellen beruht, hierbei gute Dienste. Eine große Anzahl von Autoren hat untersucht, auf welchen Bahnen der g.H.R. zustande kommt und wo die Schaltzentren zu suchen sind (Lit. bei Mall und Essen). Die Ergebnisse sind kurz dahingehend zusammenzufassen: Sensible oder sensorische Reize werden zentralwärts geleitet und verlaufen entweder direkt oder auf dem Umwege über das Großhirn zu einem vegetativen Schweißzentrum, von dem sie auf sympathischen Bahnen zur Peripherie gelangen. Diese höheren Hirnteile haben Einfluß auf den Reflex, sind aber zu seinem Zustandekommen nicht nötig. Er kann, wie Tierversuche ergeben haben, auch im Rückenmark oder allein im Grenzstrangganglion umgeschaltet werden. Bezüglich der Versuchsmethodik verweisen wir auf frühere Arbeiten (Essen 1937).

Wenn man den g.H.R. von Patienten mit vegetativ-nervösen Störungen betrachtet, so sieht man, daß dieser sehr häufig ganz anders verläuft, als wir es von den normalen Versuchspersonen her gewohnt sind; und zwar ist bei etwa 70 % der Patienten mit vegetativ-nervösen Störungen der Verlauf des g.H.R. ein viel trägerer als bei Gesunden. Die Reflexzeiten sind über die Norm hinaus verlängert. Der Reflex ist in einigen Fällen auch gar nicht auslösbar bzw. schnell zu erschöpfen. Diese Reaktionsweise wurde mit torpide bezeichnet. Bei 20 % der Patienten mit vegetativen Störungen ist der g.H.R. von abnorm kurzem, von erethischem Verlauf. Die Kranken, die an Basedow und Thyreotoxikose leiden, stellen für diese erethische Reaktionsweise besonders typische Vertreter. Spontanschwankungen, die wir als Zeichen besonderer Labilität des v.N.S. werten, finden wir in diesen Fällen sehr häufig.

Dieser Gesichtspunkt, nämlich die veränderte Funktionsweise einer autonomen Reaktion zum Angelpunkt des krankhaften Geschehens bei den Patienten mit vegetativen Störungen zu machen, hat seine besondere Bedeutung bei der Behandlung dieser Menschen. Es gelingt nämlich durch verschiedene Medikamente, den Ablauf des g.H.R. zu beschleunigen oder zu verzögern, und es drängte sich der Schluß auf, die Patienten mit einem zu trägen g.H.R. einer solchen beschleunigenden oder „Reiztherapie" zu unterziehen, während sinngemäß für die erethisch sich verhaltenden Kranken bremsende Maßnahmen angezeigt scheinen.

Der Ablauf des g.H.R. Gesunder nach Verabfolgung verschiedener Drogen ist mehrfach untersucht worden. So berichtet Schulte, daß nach 0,2 bis 0,4 g Coffein Gipfel- und Halbwertzeit deutlich verkürzt wurden. Mall fand nach verschiedenen Analeptica (Cafaspin, Hexeton, Icoral) eine Steigerung der Reflextätigkeit. Essen konnte durch große, länger fortgesetzte Sympatolgaben nachweisen, daß das Sympatol den Ablauf des g.H.R. deutlich beschleunigt und berichtete zugleich über therapeutische Erfolge bei Patienten mit torpide verlaufendem Hautreflex, in Bestätigung von Mitteilungen anderer Autoren, die ebenfalls bei vegetativ Gestörten Gutes vom Sympatol gesehen hatten.

Es soll nun die Aufgabe dieser Arbeit sein, die Wirkung weiterer Pharmaca auf den g.H.R. zu studieren. Als anregende Mittel kamen bei Patienten mit einer torpiden Reaktionsweise des g.H.R. das Strychnin, auf das Essen schon hinwies, und das Calcium zur Anwendung. Beim Basedow und den Thyreotoxikosen, die durch die erethische Reaktionsweise ausgezeichnet sind, kamen Sedativa, wie Luminal und Prominal zur Verwendung.

In unseren Versuchen wurde die Strychninwirkung auf die torpide Reaktionsweise an Kranken geprüft, die a) lediglich wegen einer Dysfunktion ihres v.N.S. bei uns in Behandlung standen. Anatomische bzw. organische Veränderungen lagen bei ihnen nicht vor. Sie hatten die üblichen Beschwerden wie Mattigkeit, Schwindel, Verstopfung, starkes Schwitzen, Kopfdruck usw. Weiterhin machten wir b) aber auch Versuche an Patienten mit Ulcus ventriculi, Gastritis sowie Colitis ulzerosa, Krankheitsbildern also, von denen bekannt ist, daß sie mit einer Störung im v.N.S. gekoppelt sind.

Methodik.

Die Auslösung und Aufzeichnung des g.H.R. geschah wie in unserer früheren Arbeit (1937) dargestellt. Wir bestimmten auch dieses Mal wieder Latenz, Gipfel- und Halbwertzeit des durch Hustenstoß hervorgerufenen Reflexes. Die Mittelwerte für diese Zeiten, errechnet aus Versuchen mit 76 gesunden Versuchspersonen, betragen 0,8, 4,5 und 10,0 Sek. 23 Kranke mit Schilddrüsenüberfunktion boten folgende Durchschnittszeiten: Latenz 0,42 Sek., Gipfelzeit 2,9 Sek. und Halbwertzeit 7,03 Sek. Außerdem zeigt der g.H.R. bei dieser Krankengruppe häufig Spontanschwankungen als Ausdruck der vegetativen Labilität. Die sogenannten torpiden Reflexe verlaufen wesentlich langsamer als die Reflexe Gesunder. Insbesondere ist die Halbwertzeit oft nicht meßbar, da die Kurve häufig gar nicht zur halben Höhe absinkt. Betreffs weiterer Einzelheiten vgl. unsere früheren Mitteilungen.

Von jedem Patienten wurde der g.H.R., Puls und Blutdruck morgens bei nüchternem Zustand, vor und alle 10–15 Min. nach der Strychnininjektion, die immer subcutan erfolgte, kontrolliert. In der Dosierung sind wir nach anfangs gewöhnlichen therapeutischen Gaben von 2—4 mg, später bis auf 7 mg Strychnin gestiegen, weil wir ein besseres Ansprechen auf höhere Dosen feststellten. Dieses zeigt ein Vergleich von 4 Versuchen bei ein und demselben Patienten, bei dem anfangs 3 mal 2 bis 3 mg Strychnin und zuletzt 5 mg Strychnin injiziert wurden. Im letzten Falle erhielten wir eine Verkürzung aller Reflexzeiten im Gegensatz zu den ersten 3 Versuchen, bei denen kein sicherer Einfluß auf Latenz- und Halbwertzeit gesehen wurde.

Ergebnisse der Versuche mit Strychnin und Calcium.

Pharmakologisch liegt die Wirkung des Strychnins in der Aufhebung der intrazentralen Hemmungen infolge Lähmung der Schaltzellen des Reflexbogens im Rückenmark (Meyer-Gottlieb). Das Wirkungsgebiet ist weiterhin das Vasomotorenzentrum und Atemzentrum und nach einer Reihe von Autoren und pharmakologischen Lehrbüchern (Meyer-Gottlieb) auch die sensorischen Zentren des Großhirns. So berichten Lichtenfeld, Fröhlich, Filehne und v. Hippel von einer Verschärfung und Verfeinerung im Tast-, Geruch-, Geschmack- und im optischen Sinn nach Gaben von Strychnin, während Schlagintweit diese Behauptungen widerlegt und eine Wirkung des Strychnins auf die sensorischen Zentren

ablehnt. Bezüglich der Strychninwirkung auf die sensorischen Zentren müssen wir uns den Versuchsergebnissen von Schlagintweit anschließen, denn obgleich wir in einigen Selbstversuchen die Maximaldosis von 5 mg Strychnin subcutan überschritten und uns bis zu 7 mg Strychnin injizierten und obgleich wir vor jedem Versuch auch den Patienten auf die Möglichkeit einer Verschärfung seiner Sinne aufmerksam machten, und auch hier nicht nur die üblichen therapeutischen Dosen (2—5 mg), sondern bis zu 7,5 mg Strychnin injiziert wurden, so konnten wir doch in keinem Falle nach der Injektion irgendeine Veränderung in der Sinnesempfindung feststellen. Zu dem Einwand, daß vielleicht gerade Kranke mit einer torpiden Reaktionsweise des g.H.R. nicht geeignet sind, derartig feine und geringe Einwirkungen aufzunehmen, ist darauf hinzuweisen, daß unter Strychnin der torpide g.H.R. immerhin oft normal wurde. Was die Erhöhung des Blutdrucks und Senkung des Pulses als Zeichen der Wirkung auf das Vasomotorenzentrum betrifft, so müssen wir annehmen, daß die Einwirkung auf diese Zentren durch Strychnin

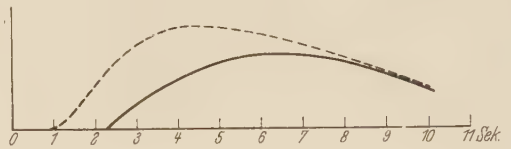


Abb. 1. Sämtliche Diagramme (bis auf Kurve VI) sind in demselben Maßstab vorgenommene Verkleinerungen der Originalkurven. ——— stellt den g.H.R. eines vegetativ Gestörten und — — — den g.H.R. bei demselben Patienten 1 Std. 55 Min. nach der subcutanen Injektion von 5 mg Strychnin dar.

erst kurz vor oder während der toxischen Dosis eintritt, denn bei unseren Versuchen (16), bei denen alle 3—5 Min. über 1 Std. lang Blutdruck und Puls kontrolliert wurden, sahen wir in keinem Falle eine Veränderung, die als Strychninwirkung gelten könnte.

Die Strychninwirkung auf den g.H.R. trat in den meisten Fällen innerhalb der ersten 30 Min., in drei Fällen erst nach 1 Std. und später auf. In vier Fällen war kurz nach der Injektion der g.H.R. besonders träge, um erst nach einiger Zeit normal zu werden. Nach einigen Stunden folgte dann auf die Verkürzung immer ein Zurückkehren in die torpide Reaktionsweise.

Wenn wir die Ergebnisse, die wir bei unseren Versuchsreihen für die beiden Gruppen a und b fanden, zusammenfassen, so können wir für a feststellen:

a) Von 5 vegetativ Gestörten zeigten 3 einen ausgesprochenen torpiden Verlauf ihres g.H.R., indem entweder die Latenzzeit (L.Z.) über 1,8 Sek. oder die Halbzeit (H.Z.) über 18 Sek. oder sowohl L.Z. als auch H.Z. verlängert waren. Zwei der vegetativ Gestörten produzierten einen normalen Reflex. Daß das klinische Bild eines vegetativ Gestörten in einigen Fällen mit einem normalen g.H.R. einhergehen kann, hat bereits der eine von uns (Essen) beschrieben. Von den 3 Patienten mit torpider Reaktionsweise ergaben alle drei 24 Min., 1 Std. und 1 Std. 55 Min. nach der Injektion von 4, 6 und 5 mg Strychnin einen normalen Reflex, indem in allen Fällen die verlängerte L.Z. und in zwei Fällen die Gipfelzeit (G.Z.) und H.Z. verkürzt waren und die Gipfelhöhe größer wurde (s. Abb. 1). Die

beiden vegetativ Gestörten mit einem normalen g.H.R. zeigten nach Strychnininjektion entweder Verkürzung der G.Z. und H.Z. oder eine Vergrößerung der Gipfelhöhe und Verkürzung der H.Z.

Für b): Von 6 vegetativ Gestörten (in 7 Versuchen) mit Gastritis (3), Ulcus ventriculi (1), Colitis ulzerosa (1), Rektumkarzinom (1) zeigten 5 einen torpiden g.H.R. Bei einem Patienten fanden wir auch vor der Injektion einen normalen Reflex. Bei den restlichen 5 Patienten mit torpider Reaktionsweise ihres g.H.R. wurde in drei Fällen 25 Min. und 12 Min. nach Injektion von 3—6 mg Strychnin der Reflex normal (s. Abb. 2),

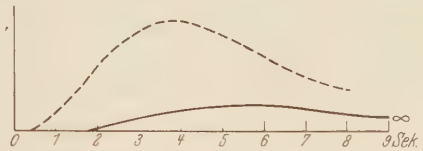


Abb. 2. Der g.H.R. eines vegetativ Gestörten mit ulcus ventriculi vor ——— und 25 Min. nach — — — Injektion von 3 mg Strychnin.

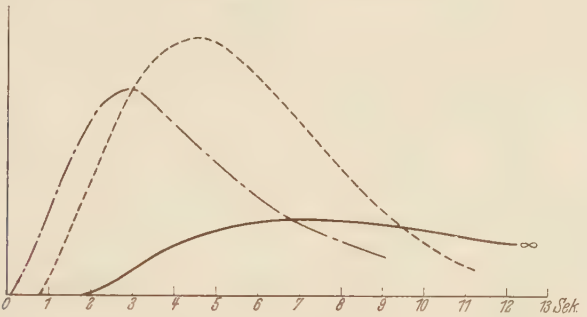


Abb. 3. Der g.H.R. eines vegetativ Gestörten mit Tetanie vor ——— und 10 Min. — — — und 1 Std. —·—·— nach Injektion von 10 ccm Calcium i. v.

indem bei dem Patienten mit Ulcus ventriculi alle Reflexzeiten und bei den Patienten mit Gastritis und Rektumkarzinom die H.Z. verkürzt wurden. Die torpide Reaktionsweise der anderen Kranken, von denen zwei unter der Diagnose einer Gastritis gingen, blieb auch nach der Injektion von 3—7,5 mg Strychnin bis zu 1 Std. 40 Min. unverändert oder der Reflex wurde gar noch träger. Die Ursache für das geringere Ansprechen der vegetativ Gestörten mit einem anatomischen Befund auf die Strychnininjektionen führen wir auf die von Essen und Schulze beschriebene Hartnäckigkeit zurück, mit der sich bestimmte Kranke mit vegetativ-nervösen Störungen, z. B. Ulcus ventriculi und Gastritis, einer Änderung ihrer vegetativen Reaktionsweise widersetzen.

Das zweite Pharmakon, durch das wir die torpide Reaktionsweise bei vegetativ Gestörten zu beeinflussen versuchten, war das Calcium, das wir bei einem Patienten mit einer echten Tetanie und bei zwei Kranken mit allgemeinen vegetativ-nervösen Störungen anwandten. Bei dem

Patienten mit der echten Tetanie, der vor der A.T. 10-Behandlung stets einen torpiden g.H.R. produzierte, wurden in beiden Fällen 10 ccm Calcium-Sandoz i. v. injiziert. Dabei sahen wir (s. Abb. 3), daß die torpide Reaktionsweise bereits 10 Min. nach der Injektion normal wurde und alle Reflexzeiten eine Verkürzung und die Gipfelhöhe eine Vergrößerung zeigten. Dieses normale Verhalten hielt über eine Stunde an. Bei einer späteren Kontrolle nach 16 Std. war der Reflex wieder torpide. Der Calciumspiegel lag in diesen Tagen bei 7,36 mg% im Serum (morgens nüchtern). Einige Wochen später, als der Blutcalciumspiegel auf normale Werte angestiegen war (nach A.T. 10-Behandlung), war der g.H.R. bei mehrfacher Kontrolle an 5 verschiedenen Tagen immer normal. Bei den anderen beiden Patienten wurde der torpide Ablauf des g.H.R. durch Injektion von 10 ccm Calcium i. v. in keiner Weise beschleunigt oder normal. Der Reflex, der bis zu 12 Min. und 48 Min. kontrolliert wurde, nahm sogar in seinem Verlauf einen immer torpideren Charakter an.

Bei der Zusammenfassung der angeführten Ergebnisse über die Beeinflussung des torpiden g.H.R. vegetativ Gestörter durch Strychnin und Calcium hat sich für das Strychnin ergeben, daß es in vielen Fällen geeignet ist, den verlangsamten Ablauf des g.H.R. zu beschleunigen. Daß dabei der torpide g.H.R. vegetativ Gestörter mit einem anatomischen Befund, z. B. Ulcus ventriculi, Gastritis, durch Strychnin nur in der Hälfte der Fälle in einen normalen verwandelt werden konnte, ist oben ausführlich beschrieben worden. Durch Calciuminjektion wurde bei einem Kranken mit echter Tetanie, der bei erniedrigten Blutcalciumwerten einen torpiden g.H.R. produzierte, vorübergehend eine normale Reaktionsweise erreicht. Nachdem durch A.T. 10-Behandlung der Blutcalciumspiegel dauernd zur Norm gebracht war, zeigte der g.H.R. bei mehrfacher Kontrolle einen normalen Verlauf. Bei der abnormen Reaktionsweise von zwei anderen vegetativ Gestörten war die Calciuminjektion ohne Erfolg.

Einfluß von Prominal und Luminal auf den g.H.R.

Während die meisten der vegetativ-nervösen Störungen mit einem verlangsamten g.H.R. einhergehen, produzieren eine kleine Gruppe von vegetativ Gestörten und die Hyperthyreosen einen beschleunigten g.H.R.

Das Trägerwerden des g.H.R. durch Sedativa am Gesunden und auch Kranken ist schon verschiedentlich untersucht worden. So stellte Veraguth fest, daß Narkotica den g.H.R. hemmen. Schulte beobachtete, daß nach oralen Gaben von 0,15—0,3 Luminal die Gipfel- und Abklingzeiten des g.H.R. von normalen Versuchspersonen auffällig länger wurden. Etwa vorhandene Spontanschwankungen verschwanden. Ein Selbstversuch mit 0,15 Luminal ergab ebenfalls eine Verlängerung aller Zeiten. Auch Mall erwähnt, daß Adalin, Abasin, Adamon und Evipan die Ausschläge stark herabsetzen und unter Umständen sogar zum Verschwinden bringen können. Über die Behandlung von vegetativ Labilen mit einem erethischen g.H.R. berichtet Essen an Hand von drei Fällen, bei denen durch Luminaletten und Bellergal ein normaler Verlauf des g.H.R. erzielt wurde.

Bei unseren Versuchen kamen Gaben von Luminal und Prominal zur Anwendung, deren Wirkung auf die erethische Reaktionsweise von Hyperthyreosen geprüft und aufgezeichnet wurde. Bei den Versuchspersonen wurden einen Tag vor den Versuchen sämtliche Medikamente abgesetzt.

Wie schon früher berichtet (1937), verhalten sich bezüglich des g.H.R. die Patienten mit dem klassischen Basedow genau so wie die sogenannten Thyreotoxikosen. Diese haben bekanntlich ebenfalls einen erhöhten Grundumsatz und klagen über Herzklopfen, Schwitzen, Nervosität usw. Sie lassen aber den Exophthalmus oder die Struma oder beides vermissen.

Wir sahen dann bei einem Basedowfall, der eine typische beschleunigte Reaktion zeigte, daß mit zunehmender Steigerung des Gefühls der Müdigkeit eine Stunde nach 0,15 Luminal die Latenz- und Halbwertszeit wesentlich verlängert waren (s. Abb. 4). Die Verlängerung aller Reflexzeiten war etwa 7 Stunden nach der Luminalgabe am größten. Dabei waren die Abklingzeiten über 18 Sek. hinaus verlängert. Bei zwei weiteren Basedowikern verschwanden nach 0,3 Prominal die anfangs vorhandenen Spontanschwankungen. Prinzipiell gleichartig wurde auch bei einigen Thyreotoxikosen durch Luminal und Prominal eine Verlangsamung des zuerst beschleunigten Reflexablaufs erzielt. Die dämpfende Wirkung von 0.1–0.15 Luminal per os machte sich in mehreren Versuchen nach 1–2 Std. bemerkbar und hielt einmal bis zu 24 Std. vor. Um einen deutlichen Prominaleffekt auf den g.H.R. zu erzielen, empfiehlt es sich, nicht unter 0.2 zu gehen. Der Wirkungseintritt liegt ebenfalls bei 1—2 Std.

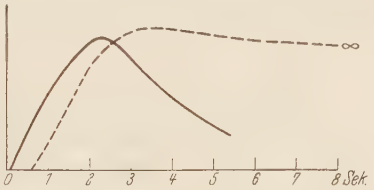


Abb. 4. Der g.H.R. einer vegetativ Gestörten mit Basedow vor ——— und 7 Std. nach — — — 0,15 g Luminal.

Nach unseren Erfahrungen haben geringere Dosierungen von Luminal und Prominal als hier beschrieben keinen deutlichen Effekt auf den g.H.R. der Hyperthyreosen, wenigstens nicht im Akutversuch. Gaben von 1–2 Luminaletten erweisen sich als wirkungslos. Man könnte bezüglich der medikamentösen Behandlung der Hyperthyreosen somit zu dem Schluß kommen, daß große Dosen von Prominal und Luminal erforderlich sind, wie das in letzter Zeit auch Hoff und Falta aus anderen Erwägungen heraus betont haben.

Bestimmung des Angriffspunktes des Strychnins und des Sympatols am galvanischen Hautreflex.

Die Ergebnisse unserer Versuche mit dem Strychnin haben ergeben, daß man mit ihm die torpide Reaktionsweise des g.H.R. von vegetativ Gestörten in eine normale verwandeln kann. Es erschien uns als eine

interessante Aufgabe, zu bestimmen, an welcher Stelle des Nervensystems die beschleunigende Wirkung des Strychnins auf den g.H.R. zur Wirkung kommt. Wie oben ausgeführt, ist für die früher bereits bekannten Folgen der Strychninvergiftung der Angriffspunkt im Rückenmark erwiesen.

Zur Lösung unserer Aufgabe stellten wir einige Selbstversuche an. Wir kontrollierten den Ablauf des g.H.R., der von den Fingern abgeleitet wurde, nach Abschnürung beider Oberarme. Dabei stellten wir fest, daß im Verlauf von 30 Min. der Reflexablauf zunehmend träger wurde. Zweifellos beruht dieses Verhalten auf einer Schädigung der Peripherie durch die gedrosselte Blutzufuhr. Es gelang dann auch nicht, durch Injektionen von 6–7 mg Strychnin eine Änderung des g.H.R. zu erzielen. Nach 30 Min. mußten auch die Staubinden abgenommen werden, da es zu erheblichen Schmerzen in den abgebundenen Gliedern kam. Wir setzten daher diese Versuche am curaresierten Frosch fort[1].

Methodik.

Wir verfuhren nach den Angaben von Schilf und Schubert. Zu Beginn eines jeden Versuchs erzielten wir mit 0,2 ccm einer 0,1 %igen Curare-Lösung nach etwa 20—30 Min. eine so vollkommene Lähmung der motorischen Endplatten, daß auch bei toxischer Strychnindosis jede Eigenbewegung des Frosches, die den Reflex hätte stören können, ausgeschlossen werden konnte. An einem Frosch konnten wir feststellen, daß dieser 72 Stunden nach der vollkommenen Curare-Lähmung wieder uneingeschränkt im Besitz seiner motorischen Funktionen war. Die Prüfung des g.H.R. geschah nach gleicher Methode, wie wir sie bei den Menschen anwandten und wie sie a. a. O. beschrieben wurde; nur statt der Finger tauchten jetzt die Hinterpfoten in die Bechergläser mit den Elektroden. Es wurden dann die Ligaturen unter Schonung der nervi ischiadici nach typischer Methode an den Oberschenkeln angelegt. Unser Auslösungsmodus war bei diesen Versuchen ein Reiz mit dem glühenden Eisenstab (Froschtöter). Nach unserer Erfahrung liegen die reflexogenen Zonen bei diesem Vorgehen besonders in den Hautgebieten auf dem Rücken und den volaren Flächen der Vorderpfoten. Während nach Meyer-Gottlieb durch Strychnin die Perzeption der Schmerzreize herabgesetzt wird, mußten wir auf Grund unserer Versuche feststellen, daß nach Strychnininjektion in fast allen Fällen eine erhöhte Empfindlichkeit für Schmerzreize eintrat und bereits das Berühren mit dem kalten Froschtöter (kalter Reiz) einen g.H.R. auslöste. Wie schon erwähnt, konnte eine Muskelzuckung als Ursache für diese Reaktion durch die vollkommene Curare-Lähmung ausgeschlossen werden.

Bestimmung des Angriffspunktes des Strychnins am g.H.R.

Nachdem wir in einem Versuch festgestellt hatten, daß trotz Unterbindung der Oberschenkel noch nach 1 Std. 46 Min. der g.H.R. unverändert auszulösen war, irgendeine Beeinflussung des g.H.R. also durch die Unterbindung noch über die Versuchsdauer hinaus ausgeschlossen werden konnte, prüften wir in einer Reihe von Versuchen die Strychninwirkung auf den g.H.R. des Frosches, und zwar:

[1] Wir danken Herrn Prof. Dr. Holzlöhner für die Überlassung einer größeren Anzahl von Fröschen und der verwandten Curare-Lösung.

a) ohne Unterbindung der Oberschenkel mit Strychnininjektion in den Bauchlymphsack,

b) mit Unterbindung der Oberschenkel und Strychnininjektion in den Bauchlymphsack,

c) mit Unterbindung der Oberschenkel und Strychnininjektion in die beiden Unterschenkel.

Für a konnten wir dabei an zwei Versuchsfröschen zeigen, daß nach Injektion von 0,5 –1 mg Strychnin in den Bauchlymphsack nach 31 Min. und 14 Min. einmal eine Verkürzung sämtlicher Reflexzeiten und das Auftreten von Spontanschwankungen, im anderen Falle eine Verkürzung der Gipfel- und Abklingzeiten, sowie in beiden Fällen das Ansprechen auf kalten Reiz festzustellen war. Eine Vergrößerung der Gipfelhöhe,

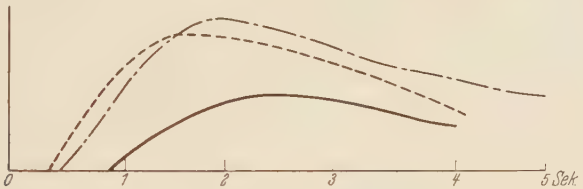


Abb. 5 (Froschversuch). Der g. H. R. eines mit Curare gelähmten Frosches bei unterbundenen Oberschenkeln vor ——— und 3 Min. — · — · — und 5 Min. — — — — nach Injektion von 1 mg Strychnin in den Brustlymphsack.

die wir als Zeichen der Strychninwirkung mit heranzuziehen versuchten, war in diesen beiden Versuchen nicht zu verzeichnen, sondern die Gipfelhöhe war nach der Injektion geringer als vor der Injektion. Wollte man die Verkürzung der Gipfelzeit und Halbwertszeit auf die kleineren Ausschläge zurückführen, so bliebe als Zeichen der stärkeren Erregbarkeit noch die Verkürzung der Latenzzeit, abgesehen von Spontanschwankungen und dem Ansprechen auf kalten Reiz. Nach 31 Min. und 54 Min. war der Reflex erloschen.

Für b. Nach der Injektion von 0,5—1 mg Strychnin in den Brustlymphsack eines Frosches bei unterbundenen Oberschenkeln sahen wir bei unseren Versuchen (7) nach 5–15 Min. in drei Fällen eine Verkürzung der Latenzzeit, in einem Falle der Gipfelzeit, in zwei Fällen der Halbwertzeit, bei 5 Versuchen eine Ansprechbarkeit auf kalten Reiz, bei 4 Fröschen Spontanschwankungen und in drei Fällen eine Vergrößerung der Gipfelhöhe (s. Abb. 5). In einem Falle war nach der Injektion überhaupt kein Reflex mehr auszulösen. Nach etwa 25 Min. war in allen Fällen der Reflex erloschen.

Für c. Nach der Injektion von 0,25 mg Strychnin in jeden Unterschenkel nach Unterbindung der Oberschenkel stellten wir bei keinem unserer Versuche (4) bis zu 2 Std. 28 Min. eine Verkürzung der Latenz-, Gipfel- oder Halbwertzeit oder das Auftreten von Spontanschwankungen

oder ein Ansprechen auf kalten Reiz fest. Die Gipfelhöhe war bis auf einen Fall nicht vergrößert. Einmal war nach der Injektion kein Reflex mehr zu erhalten. Wir glauben, daß wir dieses Verschwinden des g.H.R. im Anschluß an eine Injektion auf eine Injektionsschädigung zurückführen müssen oder auf die bekannte Tatsache, daß die Widerstandskraft der Frösche in den Monaten April und Mai, in denen unsere Versuche durchgeführt wurden, verhältnismäßig gering ist. Bei einigen Fröschen war so z. B. nach der Curare-Injektion der g.H.R. bereits nicht mehr auslösbar. Strychnininjektion war ohne Erfolg bei diesen Fröschen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche unter a, b und c läßt uns feststellen, daß die stimulierende Wirkung des Strychnins auf den g.H.R. in einem zentralen Angriffspunkt zustande kommt, weil einerseits alle dem Strychnin zuzuschreibenden Wirkungen auf den g.H.R. in jener Versuchsreihe zu verzeichnen sind, bei der durch die Unterbindung eine periphere Strychninwirkung ausgeschlossen war, andererseits bei der Strychnininjektion in die peripheren Teile der abgebundenen Extremitäten der g.H.R. über lange Zeit unverändert erhalten blieb.

Bestimmung des Angriffspunktes des Sympatols am g.H.R.

Um auch für das Sympatol, den typischen Vertreter jener Pharmaca, die auf den torpiden Verlauf eines g.H.R. im Sinne einer Verkürzung wirken (Essen), den Angriffspunkt am g.H.R. zu bestimmen, setzten wir hier die gleichen Versuche an, wie sie für das Strychnin beschrieben wurden, und kamen zu folgendem Ergebnis:

Nach der Injektion von 0,006–0,06 Sympatol in den Brustlymphsack des intakten Ganzfrosches, sahen wir, daß bei 4 Versuchen während 3–11 Min. der g.H.R. noch unverändert auszulösen war. Nach dieser Zeit war der Reflex erloschen. Der Reflex verschwand um so eher, je höher die Dosierung war. Bei der Sektion zweier Frösche aus dieser Versuchsreihe fanden wir ein schlagendes Herz. Nach der Injektion von 0,015–0,06 Sympatol in den Brustlymphsack nach Unterbindung der Beine war von 3 Versuchen in zwei Fällen bis zu 32 Min. und 20 Min. ein unveränderter Reflex auszulösen. In einem Falle war nach 17 Min. die Halbwertzeit verkürzt, was aber vielleicht auf die kleineren Ausschläge nach der Injektion zurückgeführt werden muß. Nach der Injektion von 0,015 Sympatol in jeden Unterschenkel bei unterbundenen Oberschenkeln stellten wir in allen Versuchsfällen (3) fest, daß nach 2–4 Min. kein g.H.R. auszulösen war.

Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt, daß unter den Versuchen, bei denen eine periphere Wirkung des Sympatols durch die Unterbindung der Oberschenkel verhindert ist, der g.H.R. am längsten bis zu 32 Min. und 20 Min. unverändert auslösbar bleibt, während am intakten Ganzfrosch nach 3–11 Min. die Reflexe bereits nicht mehr auszulösen sind. Besonders aber die Tatsache, daß das Sympatol bei Injektion in die abgebundenen

Beine prompt zu einem Verlöschen des g.H.R. führt, läßt den Schluß zu, daß die lähmende Wirkung peripher angreifen muß. Während beim Menschen das Sympatol den g.H.R. fördert, wirkt es also beim Frosch hemmend.

Zusammenfassung.

Wir hatten uns in dieser Arbeit zur Aufgabe gestellt, erstens die pharmakologische Beeinflussung des g.H.R. zu studieren und zweitens festzustellen, ob das Sympotal und Strychnin peripher oder zentral den g.H.R. verändert.

Nachdem zwischen den zwei pathologischen Reaktionsweisen des g.H.R. unterschieden worden war und wir für die torpide und erethische Verlaufsform bestimmte Kriterien aufgezählt hatten, brachten wir bei den vegetativ Gestörten mit einem zu trägen g.H.R. Strychnin und Calcium und bei den Patienten mit einem erethischen Reflex Sedativa (Luminal und Prominal) zur Anwendung. Dabei konnten wir für das Strychnin beweisen, daß es in vielen Fällen geeignet ist, den torpiden Reflex von vegetativ Gestörten in einen normalen zu verwandeln und daß es damit für die Therapie dieser Krankheiten eine gewisse Berechtigung hat. Allerdings müßte nach unserer Erfahrung die Einzeldosis nicht weniger als 4–7 mg betragen, um überhaupt die beabsichtigte Wirkung auf den g.H.R. zu erreichen.

Bei den vegetativ Gestörten mit einem anatomischen Befund (Ulcus ventriculi, Gastritis u. a.) konnten wir nur bei der Hälfte unserer Versuchspersonen über eine beschleunigende Wirkung des Strychnins auf den torpiden Verlauf des g.H.R. berichten. Unsere Versuche mit Calcium bei verschiedenen Krankheitsbildern, die mit einer torpiden Reaktionsweise ihres v.N.S. einherging, waren nur bei einem Kranken mit echter Tetanie erfolgreich. Hier wurde nach Calcium der Reflex normal und sämtliche Reflexzeiten verkürzt. Über die Wirkung von Luminal auf den erethischen g.H.R. von Thyreotoxikosen und bei Morbus Basedowi berichteten einige Versuche, die alle zeigten, daß unter Luminal der abnorme g.H.R. normal wurde. Eine entsprechende Einwirkung des Prominals auf den beschleunigten g.H.R. konnte bei den Thyreotoxikosen gezeigt werden. Auch hier ergaben erst relativ große Dosen von Luminal (0,15) und Prominal (0,3) den gewünschten Erfolg.

Im zweiten Teil unserer Arbeit bestimmten wir den Angriffspunkt von Strychnin und Sympatol am g.H.R. Dabei konnte für das Strychnin ein zentraler Angriffspunkt bezüglich der beschleunigenden Wirkung auf den g.H.R. nachgewiesen werden. Das Sympatol zeigte im Froschversuch eine lähmende Wirkung auf den g.H.R.; seinen Angriffspunkt auf den g.H.R. konnten wir als in der Peripherie gelegen nachweisen.

I. Strychnin und Calcium können den torpiden galvanischen Hautreflex bestimmter Gruppen von vegetativ Gestörten in einen normalen Reflex verwandeln.

II. In Versuchen mit Luminal und Prominal zeigten wir, daß diese Sedativa auf den beschleunigten galvanischen Hautreflex von Basedow-Kranken und Thyreotoxikosen im Sinne einer Verzögerung des Reflexablaufes und Verlängerung der Reflexzeiten wirken.

III. Im Froschversuch wurde der Angriffspunkt des Strychnins und des Sympatols am galvanischen Hautreflex bestimmt. Wir fanden für das Strychnin einen zentralen, für das Sympatol einen in der Peripherie liegenden Angriffspunkt.

Literatur.

v. Bergmann: Funktionelle Pathologie, Berlin 1936. — Braeucker, W.: Nervenarzt **6**, 449 (1933). — Danielopulu: Klin. Wschr. **1928**, Nr. 37. — Eppinger u. Hess: Die Vagotonie, Berlin 1910. — Essen, K. W.: Dtsch. med. Wschr. **1938**, II, S. 1205; Med. Klin. **1938**, I, H. 7; Z. Klin. Med. **132**, 191 (1937). — Falta, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1937. — Filehne: Pflügers Arch. **83**, 369 (1901). — Fröhlich: Ebenda **6**, 322 (1851). — Gildemeister: Ebenda **197**, 432 (1922); Bethes Handbuch **8**/2, 766 (1928). — v. Hippel: Berlin 1873. — Hoff, F.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1937. — Lichtenfels: Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. Wiss. **6**, 338 (1851). — Mall, G. D.: Z. Psychol. **138**, 329 (1936). — Meyer-Gottlieb: Exper. Pharmakologie 1925. — Müller, L. R.: Lebensnerven, Berlin 1931. — Reiser, K. A.: Z. Zellforsch. usw. **17**, 610 (1933). — Schilf u. Schubert: Pflügers Arch. **195**, 75 (1922). — Schlagintweit: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **95**, 104 (1922). — Schulte: Z. Neur. **155**, 488 (1936). — Schulze, W.: Inaugural-Dissertation 1937, Kiel. — Sunder-Plassmann: Med. Klin. **1934**, S. 432 u. 476. — Stöhr jr.: Z. Anat. u. Entw.gesch. **104**, 133 (1935). — Veraguth: Das psychogalvanische Reflexphänomen, Berlin 1909.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg.
(Direktor: Professor Dr. Eichholtz.)

Versuche mit Aneurinester am Blutegel, Rattendarm und am Blutdruck der Katze.

Von
Willi Riechert und **Heinrich Hübschmann.**

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Januar 1940.)

Die Erkenntnis von Lohmann, daß das Aneurin (Vit. B_1) als Phosphorsäure die prosthetische Gruppe der Carboxylase bildet, hat das Vitamin B_1 erneut in den Brennpunkt der physiologischen Forschung gestellt. Hinzu kommen die Beobachtungen von Minz und von v. Muralt, die in Erfahrung brachten, daß vom erregten Nerven außer Acetylcholin auch noch Aneurin an die Umgebung abgegeben wird. Weitere Versuche von Minz[1, 2, 3] ließen eine eigentümliche Beeinflussung der Acetylcholinwirkung durch Aneurin erkennen, die dahin gedeutet worden ist, daß Aneurin die Acetylcholinwirkung sensibilisiert. Wenn man ein Blutegelpräparat nach den Angaben von Minz mit Vitamin B_1 vorbehandelt und nachher auf dieses Acetylcholin einwirken läßt, so tritt eine Verstärkung der Acetylcholinwirkung auf, während Aneurin allein keine Kontraktion verursacht. Am Rattendarm konnte Minz die gleiche Beobachtung machen. Beim Blutdruck der Katze zeigte sich eine analoge Wirkung. Einige Minuten nach der Injektion von Aneurin trat eine intensivere und anhaltendere Wirkung von Acetylcholin auf.

E. und R. Abderhalden[4] konnten diese Versuchsergebnisse am Taubendarm bestätigen. Sie stellten die Reizschwelle für Acetylcholin am Taubendarm gesunder Tiere fest. Nach Einwirkung von Aneurin trat schon bei anfänglich unterschwelligen Reizen eine Kontraktion des Darmes auf. Am avitaminotischen Darm war die Reizschwelle von Acetylcholin allgemein herabgesetzt, die aber sofort nach geringen Dosen von Aneurin normale Werte annahm.

Briem[5] hat nun analoge Versuche mit Aneurin und Acetylcholin am quergestreiften Muskel (Frosch-Sartorius und Frosch-Rectus) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ließen in erster Linie eine

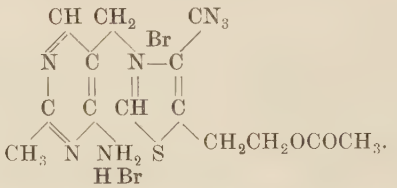
[1] Agid, R., u. C. Minz: Soc. Biol. **126**, Nr. 33 (1937). — [2] Minz, C.: C. r. acad. Sci. Paris **205**, 576—577 (1937). — [3] Minz, C.: Ebenda **127**, 1251 (1938). — [4] Abderhalden, E., u. R.: Pflügers Arch. **240**, 388 (1938). — [5] Briem, H.: Ebenda **242** Heft 4, 450 (1939).

ermüdungsverzögernde Wirkung durch Aneurin erkennen, und außerdem trat eine Verstärkung der Acetylcholinwirkung auf.

Hübschmann [6] konnte dagegen eine Sensibilisierung von Acetylcholin durch Aneurin am Rattendarm nicht bestätigen.

Eine gewisse chemische Verwandtschaft zwischen dem Aneurin und Cholin (quartäre Ammoniumbasen—primäre Alkohole) brachte Kuhn [6] und seine Mitarbeiter zu der Überlegung, ob sich nicht analog der Wirkungsverstärkung des Cholins durch Acetylierung eine bisher nicht sichtbare Wirkung des Aneurins ergeben würde.

Aus diesem Grunde wurde von Th. Wieland die O-Acetylaneurinverbindung hergestellt, die als Hydrobromid folgende chemische Konstitution aufweist:



Bei der biologischen Prüfung am Rattendarm zeigte sich keine Sensibilisierung, statt dessen aber rief es überraschenderweise selbst eine Kontraktion hervor. Bei 10 γ Bromid-Bromhydrat in 50 ccm Tyrodelösung lag die untere Nachweisbarkeitsgrenze, was ungefähr der Reizschwelle des Cholins entspricht. Damit war zum ersten Male die direkte pharmakologische Wirkung eines Vitamins bzw. Vitaminesters beobachtet worden, und es schien von Interesse, nach weiteren Wirkungen des Aneurins und einiger seiner Ester zu suchen.

In der vorliegenden Arbeit interessierte besonders die Wirkung des Aneurins und seiner Ester, der Essigsäure, Benzoesäure und der Phosphorsäure in ihrer Wirkung auf das Blutegelpräparat und auf den Blutdruck der Katze.

Blutegelversuche.

Die Versuchsanordnung ist die von Führer [7] beschriebene. Als Badeflüssigkeit wurde die von Bergami [8] angegebene Salzlösung verwendet, in der das Blutegelpräparat die größte Empfindlichkeit zeigen soll. Die Substanzen wurden gleichzeitig auf Sensibilisierung des Acetylcholins und auf Eigenwirkung hin geprüft. Aneurin und die drei Ester wurden in äquimolaren Mengen gegeben, so daß sie in der Badeflüssigkeit immer eine Konzentration von $m/2 \cdot 10^4$ hatten, und zwar wurden die Substanzen

[6] Kuhn, R., Th. Wieland u. H. Hübschmann: Z. physiol. Chem. **259**, Heft 1, 48 (1939). — [7] Führer, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **82**, 81 (1937). — [8] Bergami, G.: Klin. Wschr. **1930**, S. 1030.

jeweils 2 Minuten vor der Acetylcholingabe der Badeflüssigkeit zugesetzt. Jede Kontraktion in der Abb. 1 entspricht einer Acetylcholinkonzentration von $5 \cdot 10^{-8}$.

Weder Aneurin noch seine drei Ester zeigten irgendeine Sensibilisierung noch Eigenwirkung. Dagegen ergab Acetylaneurin eine deutliche Hemmung der Acetylcholinkontraktion, eine Beobachtung, die nach einer mündlichen Mitteilung von Herrn Prof. Kuhn auch Dale gemacht hat. Die Wirkung des Essigsäureesters war einigermaßen spezifisch, da sowohl der Phosphorsäure- wie der Benzoesäureester keine hemmende Wirkung zeigten.

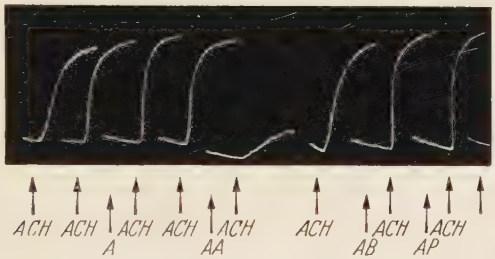


Abb. 1. Wirkung des Aneurins und seiner Ester auf den Rückenmuskel des Blutegels.

ACH = Acetylcholin $5 \cdot 10^{-8}$
A = Aneurin
AA = Acetylaneurin
AP = Aneurinphosphorsäure
AB = Benzoylaneurin
} $\frac{n_1}{2} \cdot 10^{-4}$

Rattendarmversuche.

Die Methodik war die gleiche, wie sie von Kuhn, Wieland, Hübschmann beschrieben wurde. Neben Acetylaneurin bewirkte in dem gleichen Konzentrationsbereich auch Cocarboxylase eine Kontraktion des Rattendarmstückes. Eine Sensibilisierung des Acetylcholins wurde nicht beobachtet. Leider konnten nur einige wenige Versuche ausgeführt werden, da die zur Verfügung stehende Substanzmenge sehr gering war.

Blutdruckversuche an der Katze.

Die Versuchsanordnung der Blutdruckmessung, nach der die folgenden Untersuchungen durchgeführt wurden, ist in einer früheren Arbeit von Riechert[9] und Schipkus beschrieben.

Um den Sensibilisierungseffekt von Aneurin auf die Wirkung von Acetylcholin am Blutdrucktest festzustellen, wurden in Abständen von einigen Minuten mehrere Einzelinjektionen von 1 γ Acetylcholin durchgeführt, um den normalen Verlauf der Senkungskurve zu studieren. Nach

[9] Riechert, W., u. E. Schipkus: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 372 (1939).

der letzten Acetylcholininjektion wurden 5 Min. 40 Sek. danach 15 mg Aneurin intravenös gegeben, dann abwechselnd 1 γ Acetylcholin, 15 mg Aneurin usw., wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist.

Im Verlaufe dieser Versuchsserie fanden 4 Injektionen von 15 mg (im ganzen 60 mg Aneurin) statt. Die Blutdrucksenkung der 4 Acetylcholininjektionen betrug im Durchschnitt 45 mm, die Dauer, d. h. vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Wiederanstieg der Senkung zum normalen Blutdruckniveau 1 Min. 40 Sek. Diese Werte entsprechen den normalen 1 γ-Acetylcholin-Einzelinjektionen.

Tabelle 1.

Mittel	Dosis pro Tier	Senkung Hg mm	Wirkungsdauer	Zeitpunkt zwischen den einzelnen Injektionen	Blutdruck mm
Ac-Chol	1 γ	45	1 Min. 40 Sek.		150
Ac-Chol	1 γ	45	1 Min. 30 Sek.	3 Min.	150
Aneurin	15 mg	keine Wirkung	—	5 Min. 40 Sek.	150
Ac-Chol	1 γ	50	1 Min. 40 Sek.	2 Min.	150
Aneurin	15 mg	keine Wirkung	—	4 Min.	150
Ac-Chol	1 γ	50	1 Min. 40 Sek.	3 Min.	150
Aneurin	15 mg	keine Wirkung	—	4 Min. 20 Sek.	150
Ac-Chol	1 γ	50	1 Min. 40 Sek.	2 Min.	150
Aneurin	15 mg	keine Wirkung	—	4 Min. 10 Sek.	150
Ac-Chol	1 γ	50	1 Min. 40 Sek.	2 Min. 40 Sek.	150

Die zwischen den Aneuringaben liegenden Senkungskurven durch Acetylcholin zeigen keine Abweichung in bezug auf Wirkungsintensität und Wirkungsdauer. Die Senkung betrug im einzelnen 50 mm, die Dauer 1 Min. und 40 Sek. Die letzte Acetylcholinkurve nach der 4. Aneuringabe zeigte die gleichen Werte. Die Zeit zwischen den einzelnen Injektionen kann aus Tabelle 1 ersehen werden.

Am Anfang des Versuchs betrug der Blutdruck 150 mm Hg. Dieser veränderte sich nicht während der Versuchszeit und auch nach längerer Zeit nach dieser Versuchsserie bleibt er weiterhin konstant.

Einzelinjektionen mit steigernder Konzentration von Aneurin in dem Bereich wie die folgenden Acetylaneurin- und Benzoylaneurinversuche zeigen keinen Einfluß auf den Blutdruck; ferner konnte auch keine allmähliche, sich über eine längere Zeit erstreckende Blutdrucksenkung beobachtet werden.

Aus den Ergebnissen der soeben beschriebenen Versuche ist zu ersehen, daß Aneurin keinen Effekt auf den Blutdruck ausübt, und die Wirkungsintensität und Wirkungsdauer der Blutdrucksenkung von Acetylcholin wird durch Aneurin nicht beeinflußt.

Vorversuche mit Acetylaneurin ergeben bei der Konzentration von 1 mg, intravenös gegeben, einen Blutdruckeffekt im Sinne einer Senkung.

So wurden in der zweiten Versuchsserie Einzelinjektionen von Acetylaneurin gegeben. Die niedrigste Dosis, die gerade noch eine angedeutete Senkung hervorruft, liegt bei 0,1 mg pro Tier Acetylaneurin. Je höher die Konzentration steigt, um so tiefer fällt der Blutdruck und um so länger ist die Wirkung. Gegenüber von Acetylcholin ist der Abfall des Blutdrucks weniger steil und die Wirkungszeit ist außerdem bedeutend verlängert. Der allmähliche Abfall der Senkung kommt besonders bei geringeren Konzentrationen zum Ausdruck. Die einzelnen Werte der Senkung und die Zeit der Wirkungsdauer bei verschiedenen Konzentrationen gibt Tabelle 2 an.

Tabelle 2.

Acetylaneurin-dosis pro Tier mg	Blutdruck-senkung Hg mm	Wirkungsdauer Min.	Wirkungsdauer Sek.	Acetylaneurin-dosis pro Tier mg	Blutdruck-senkung Hg mm	Wirkungsdauer Min.	Wirkungsdauer Sek.
0,1	10		50	1,0	20	1	40
0,2	12	1	10	2,5	30	2	50
0,3	16	1	50	5,0	40	3	30
0,4	16	1	20	10,0	55	4	40
0,5	20	1	40	30,0	75	6	50

Kurve 1 zeigt den Verlauf der Senkungskurven von 1 mg und 5 mg Acetylaneurin.

Bei ähnlichen Versuchen mit dem Benzoesäureester des Aneurins ergaben sich ähnliche Effekte auf den Blutdruck wie beim Acetylaneurin. Die geringste Konzentration, die eine Senkung noch hervorruft, beträgt 0,5 mg pro Tier. Ein wesentlicher Unterschied gegenüber dem Acetylaneurin besteht im Wirkungsverlauf nicht. Hier trifft genau das gleiche wie beim Acetylaneurin gegenüber der Acetylcholinwirkung zu. Kurve 2 zeigt die Blutdruckkurven von 0,5 mg, 1 mg und 5 mg Benzoylaneurin gegenüber einer Einzelinjektion von 0,1 Acetylcholin.

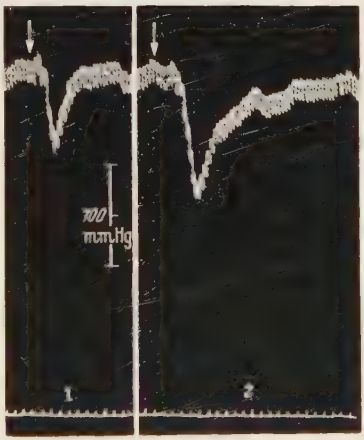


Abb. 2. Katze ♂, 2700 g. Narkose: 0,075 g Chloralose kg/Tier, 2,5 g Urethan pro Tier. Zeitschreibung: 10 Sek. 1. 1 mg Acetylaneurin, 2. 5 mg Acetylaneurin.

In Tabelle 3 sind die Werte der Blutdrucksenkung und Dauer bei den verschiedenen Konzentrationen von Benzoylaneurin angegeben.

Eine Beeinflussung der Acetylcholinwirkung konnte wie beim Aneurin durch Acetyl- und Benzoylaneurin nicht beobachtet werden. Die Blutdruckkurve von Acetylcholin wich nicht nach Acetyl- und Benzoylaneuringaben von ihrem normalen Wirkungsverlauf ab.

Tabelle 3.

Benzoyl-aneurindosis pro Tier mg	Blutdruck-senkung Hg mm	Wirkungsdauer Min.	Sek.	Benzoyl-aneurindosis pro Tier mg	Blutdruck-senkung Hg mm	Wirkungsdauer Min.	Sek.
0,5	10	1		5,0	36	3	30
1,0	16	1	20	10,0	50	4	30
1,25	20	2		30,0	65	7	
2,5	30	2	30				

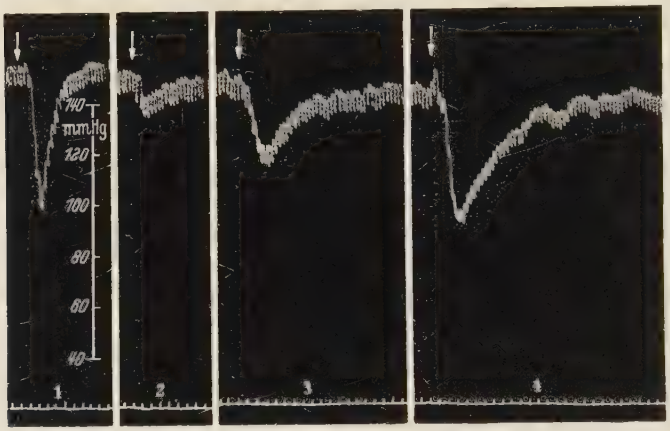


Abb. 3. Katze ♂, 2700 g. Narkose: 0,075 g Chloralose kg/Tier, 2,5 g Urethan pro Tier. Zeitschreibung: 10 Sek.
1. 1 γ Acetylcholin, 2. 0,5 mg Benzoylaneurin, 3. 1 mg Benzoylaneurin, 4. 1 mg Benzoylaneurin.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

In keinem Falle konnte irgendeine Wirkung des Aneurins allein, weder eine Sensibilisierung noch eine Eigenwirkung beobachtet werden. Eine Eigenwirkung des Aneurins (am Froschherzen) wurde bisher nur von Agid und Balkanyi [10] festgestellt. Von dieser aber wies P. Kaiser [11] nach, daß sie auf einen unspezifischen Säureeffekt zurückzuführen war. Dagegen zeigten die Aneurinester der Essigsäure, Benzoesäure und Phosphorsäure deutliche Wirkungen. Dabei schien ein gewisser Unterschied in der Wirkung bei Kalt- und Warmblütern zu bestehen.

Beim Blutegel fand eine Beeinflussung der Acetylcholinkontraktion durch Acetylaneurin statt, aber nicht, wie erwartet wurde, eine Sensibilisierung, sondern eine deutliche Hemmung. Auch Briem und Kaiser fanden beim Kaltblüter (Herz und Sartorius des Frosches) eine Abschwächung der Acetylcholinwirkung, allerdings nicht durch einen Aneurinester, sondern durch Aneurin allein.

[10] Agid, R., u. J. Balkanyi: C. r. Soc. Biol. **127**, 680 (1938). — [11] Kaiser, P.: Pflügers Arch. **242**, Heft 4, 504 (1939).

Beim Warmblüter riefen die verwendeten Aneurinester eine deutliche Eigenwirkung hervor, und zwar beim Rattendarm und beim Blutdruck der Katze. Eine Hemmung der Acetylcholinwirkung war nicht zu beobachten, ebenfalls keine Sensibilisierung.

Nach den vorliegenden Versuchen kann man allgemein von einer acetylcholinähnlichen Wirkung der Aneurinester nicht sprechen. Dies war ganz deutlich beim Kaltblüter, wo geradezu eine entgegengesetzte Wirkung bestand. Beim Warmblüter (Rattendarm) schien anfangs eine acetylcholinähnliche Wirkung vorhanden zu sein. Die Art der Kontraktion und die Erschlaffung des Darmstückes zeigte keine Unterschiede gegenüber der durch Acetylcholin hervorgerufenen Kontraktion. Ein Wirkungsunterschied trat bei den Blutdruckversuchen hervor. Gegenüber dem Verlauf der durch Acetylcholin hervorgerufenen Blutdrucksenkungskurve zeigten die Kurven von Benzoyl- und Acetylaneurin deutliche Unterschiede. Während beim Acetylcholin ein plötzlicher Blutdruckabfall und ein rascher Wiederanstieg zu beobachten war, fiel der Blutdruck bei den genannten Aneurinestern allmählich und stieg auch langsamer wieder an.

Zusammenfassung.

1. Am Blutegelpräparat, am Rattendarm und am Blutdruck der Katze hat Aneurin allein weder eine Eigenwirkung noch zeigt es eine Beeinflussung der Acetylcholinwirkung.

2. Beim Blutegel hemmt Acetylaneurin die Acetylcholinwirkung.

3. Beim Warmblüter zeigen sich Einwirkungen von Aneurinestern: Beim Rattendarm rufen neben Acetylaneurin auch Cocarboxylase eine Kontraktion, beim Blutdruck der Katze Acetylaneurin und Benzoylaneurin eine Senkung hervor.

Für vielfachen Rat und für die Überlassung von Acetyl- und Benzoylaneurin sagen wir an dieser Stelle Herrn Prof. Kuhn und Herrn Dr. Th. Wieland unseren Dank. Die Cocarboxylase wurde von Herrn Th. Wieland unter Mithilfe von H. Hübschmann nach der Vorschrift aus dem Journal Amerikan Chemical Society, Bd. 60, S. 2263 (1938) hergestellt. Das verwendete Acetylcholin stammte von der Firma Hoffmann-La Roche, Berlin.

Weiterhin sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft gedankt, die dem einen von uns (H. H.) die vorliegende Arbeit ermöglichte.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg.
(Direktor: Professor Dr. Fr. Eichholtz.)

Weitere Blutdruckversuche an der Katze mit Acetylaneurin und Benzoylaneurin.

Von
Willi Riechert.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 22. Januar 1940.)

Da in der vorangehenden Arbeit die Beobachtung gemacht wurde, daß Acetyl- und Benzoylaneurin einen Blutdruckeffekt hervorrufen, erhob sich die Frage, auf welchem Wirkungswege dieser Effekt zustande kommt.

Beim Acetylcholin ist das Ausbleiben der Wirkung auf den Blutdruck nach Atropin dadurch erklärt, daß dieses den Parasympathicus lähmt und hiermit dem Acetylcholin der Angriffspunkt fehlt. Nach den bisherigen Beobachtungen am Blutegel und am Blutdruck der Katze bestand ein Unterschied in der Wirkung des Acetyl- und Benzoylaneurins dem Acetylcholin gegenüber, so daß vermutet werden konnte, daß diese beiden Substanzen auch einen verschiedenen Angriffspunkt gegenüber dem Acetylcholin haben.

Ferner interessierte die Frage, ob die Cholinesterase das Acetyl- und Benzoylaneurin spaltet und dadurch die Blutdruckwirkung zustande kommt. H. Süllmann und H. Birkhauser[1] einerseits und L. Massart und R. Dufait[2] andererseits konnten unabhängig voneinander die hydrolytische Spaltung des Acetyl- und Benzoylaneurins durch die Cholinesterase feststellen. Wird die Cholinesterase durch Physostigmin oder Ergotamintartrat (Gynergen) gelähmt, so tritt am Blutdruck bekanntlich eine wesentliche Verlängerung der Acetylcholinwirkung auf, die durch die verzögerte Verseifung bedingt ist (W. Riechert und W. Musehold[3]).

Wie verhalten sich nun die Blutdrucksenkungskurven von Acetyl- und Benzoylaneurin nach Lähmung der Cholinesterase? Dieses war die zweite Frage, die durch die folgenden Untersuchungen geklärt werden sollte.

Methodik.

Die Blutdruckmessungen wurden an Katzen, die mit Chloralose (0.075 g pro kg Tier und 2.5 g Urethan pro Tier) narkotisiert waren, mit

[1] Süllmann, H., u. H. Birkhauser: Schweiz. med. Wschr., Jahrg. 69, Nr. 28, S. 648 (1939). — [2] Massart, L., u. R. Dufait: Naturw., Jahrg. 27, Heft 33, S. 567 (1939). — [3] Riechert, W., u. W. Musehold: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 524 (1939).

der Trendelenburgschen Gegeninfusionsapparatur durchgeführt. Die Beschreibung der Versuchsanordnung siehe (W. Riechert und E. Schipkus [4]).

Blutdruckversuche.

Nach mehreren Einzelinjektionen von Acetylcholin wurde Atropin (1 mg) gegeben und dann 20—30 Minuten danach die Einzelinjektionen wiederholt. Nach der Atropinisierung zeigten an und für sich wirksame Dosen von Acetylcholin keine Blutdruckwirkung mehr. Anschließend erfolgten Einzelinjektionen von Acetyl- und Benzoylaneurin (1—10 mg pro Tier), deren Effekt vorher genau bestimmt wurde. Eine Aufhebung der Wirkung wie beim Acetylcholin dieser beiden Substanzen nach Lähmung des Parasympathicus konnte nicht beobachtet werden.

In der zweiten Versuchsserie wurde in der Anordnung der einzelnen Injektionen vor und nach Lähmung der Cholinesterase durch Gynergen ähnlich verfahren.

Nach mehreren Kontrollinjektionen von Acetylcholin, Acetyl- und Benzoylaneurin wurde intramuskulär Gynergen (0.5 mg pro kg Tier) gespritzt und 30 Minuten gewartet und danach des öfteren in gewissen Zeitabständen solange Acetylcholin intravenös gegeben, bis eine deutliche Verlängerung der Wirkung gegenüber der normalen Acetylcholinkurve auftrat. Anschließend erfolgten die entsprechenden Injektionen von Acetyl- und Benzoylaneurin.

Tabelle 1 gibt die Werte der Blutdrucksenkung und der Wirkungsdauer von Acetyl- und Benzoylaneurin an, die nach Gynergenisierung gewonnen wurden.

Tabelle 1.

Ace-Aneurin-Dosen in mg pro Tier	Senkung mm Hg	Dauer Min.	Dauer Sek.	Benzoyl-aneurin mg	Senkung mm Hg	Dauer Min.
0,1—0,4	Keine Wirkung			0,5—2,5	Keine Wirkung	
0,5	6	1	10	5,0	10	3
1,0	8	1	10	10,0	25	8
2,5	8	1	30	20,0	65	15
5,0	30	5	30	30,0	65	15
10,0	45	6	30			
30,0	55	8				

0,1—0,4 mg Acetylaneurin rufen vor der Lähmung der Cholinesterase einen deutlichen Effekt hervor, wie Tabelle 2 der vorangehenden Arbeit angibt. Nach der Lähmung sind sie wirkungslos. Erst bei 0.5 mg tritt eine nur angedeutete Senkung von etwa 10 mm ein, die schon nach einigen Sekunden den normalen Ausgangswert erreicht. Bei steigender Konzentration nehmen Wirkungsintensität und Wirkungsdauer zu. Die Senkung

[4] Riechert, W., u. E. Schipkus: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 524 (1939).

bleibt jedoch gegenüber den entsprechenden Werten vor der Gynergenisierung zurück, während die Wirkungsdauer von 5,0 mg ab deutlich zunimmt.

Beim Benzoylaneurin tritt dieser Unterschied noch deutlicher hervor. Hier bleiben die Dosen von 0,5—2,5 mg wirkungslos. Erst bei 5 mg tritt eine angedeutete Senkung von 10 mm auf. Auch hier gilt das vom Acetylaneurin Gesagte, daß nach Lähmung der Esterase die Wirkungsintensität gegenüber derjenigen vor der Lähmung zurückbleibt und weiterhin bei Konzentrationen von 10—30 mg Benzoylaneurin die Verlängerung der Wirkung noch deutlicher zunimmt. Kurve 1 zeigt den Verlauf der Senkungskurve von 10 mg Benzoylaneurin

Abb. 1. Katze, 3200 g. Narkose: 0,075 g Chloralose kg/Tier. 2,5 g Urethan pro Tier. Zeitschreibung: 10 Sek. 10 mg Benzoylaneurin nach Gynergenisierung.

Der Abfall des Blutdrucks ist hier bedeutend verzögert und damit der Verlauf der Kurve bis zum tiefsten Senkungsniveau flacher, und außerdem tritt danach ein ganz allmähliches Ansteigen der Kurve bis zum Ausgangsniveau ein.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Blutdrucksenkung an der Katze durch Acetyl- und Benzoylaneurin wird durch Atropin nicht aufgehoben. Damit scheint der Angriffspunkt dieser Substanzen gegenüber dem Acetylcholin nicht der gleiche zu sein. Damit kommt der Unterschied in der Wirkung gegenüber dem Acetylcholin, auf den schon in der vorangehenden Arbeit hingewiesen wurde, noch deutlicher zum Ausdruck. Danach sind Acetyl- und Benzoylaneurin in ihrem Wirkungsmechanismus nicht als acetylcholinähnlich anzusprechen.

Die Frage, ob das Acetylaneurin durch die Cholinesterase gespalten wird, haben L. Massart und R. Dufait einerseits und H. Süllmann und H. Birkhauser andererseits durch hydrolytische Spaltung des

Acetylaneurins durch cholinesterasehaltige Substrate zu klären versucht. In beiden Arbeiten stimmen die Ergebnisse über die Spaltung des Acetylaneurins überein, während L. Massart und R. Dufait auch eine Spaltung durch Pferdeserum feststellen konnten, was die beiden anderen Autoren nicht mit Sicherheit beobachten konnten. Genau so wie beim Acetylcholin besteht auch bei Acetylaneurin eine Hemmung der Hydrolyse durch Physostigmin (molar $^5/_{1000}$). Im Gegensatz zur Acetylcholinhydrolyse findet diejenige von Acetylaneurin bedeutend langsamer statt, und zwar im Verhältnis 1 : 10. H. Süllmann und H. Birkhauser stellten weiterhin eine Verzögerung der Acetylcholinspaltung durch Aneurin und Acetylaneurin fest, die bei 0,05—0,5 mg in 2 ccm der Versuchslösung 25 % und in mg Dosen 60 % beträgt.

Die Spaltung des Acetyl- und auch des Benzoylaneurins durch die Cholinesterase findet eine Bestätigung durch die oben beschriebenen Versuchsergebnisse am Blutdruck der Katze. Fernerhin zeigt der Wirkungsverlauf der Blutdrucksenkung dieser beiden Substanzen eine langsamere Verseifung durch die Cholinesterase, was sich schon an den normalen Senkungskurven, besonders aber nach Lähmung der Cholinesterase ergibt.

Als Vergleich hierfür ist die Wirkung auf den Blutdruck von Acetylcholin vor und nach der Lähmung der Esterase anzusehen. W. Riechert und W. Musehold haben diese Verhältnisse in einer früheren Arbeit beschrieben. Während durch das Acetylcholin ein plötzlicher Abfall des Blutdrucks und sofortiger Wiederanstieg hervorgerufen wird, wird die Verseifung des Acetylcholins nach der Lähmung der Cholinesterase verzögert und dadurch die Wirkungsdauer verlängert. Beim Acetyl- und Benzoylaneurin scheint eine vollständige Verseifung nicht sofort einzutreten, was H. Süllmann und H. Birkhauser mit dem hydrolytischen Spaltungsverhältnis von Acetylcholin gegenüber dem Acetylaneurin mit 1 : 10 angeben. Danach wirkt die Cholinesterase also 10mal schwächer auf das Acetylaneurin ein. Hieraus erklärt sich der langsame Abfall und die bedeutend verlängerte Wirkung im Vergleich zum Acetylcholin. Je gehemmter die Verseifung ist, um so geringer muß die Blutdrucksenkung sein und um so länger die Wirkungsdauer. Dieses trifft beim Acetyl- und auch Benzoylaneurin in jedem Falle zu.

Schon beim Acetylaneurin konnte im Blutdruckversuch eine Erhöhung der wirksamen Dosis nach Lähmung der Esterase von 0,1 auf 0,5 mg festgestellt werden. Erst höhere Dosen zeigen eine wesentlich reduzierte Wirkungsintensität und auch Wirkungsdauer, wie aus dem Vergleich dieser Werte vor und nach der Lähmung der Esterase hervorgeht. Wird nun noch mehr Acetylaneurin zugeführt, so tritt analog dem Acetylcholin besonders eine Verlängerung der Wirkungsdauer auf, da über einen längeren Zeitraum noch unzerstörtes Acetyl- und Benzoylaneurin einwirken können.

Das Benzoylaneurin, das an und für sich schon als Benzoesäureester schwerer verseifbar gegenüber dem Essigsäureester ist, wird so durch die

Cholinesterase noch schwerer angegriffen. Die entsprechenden Senkungskurven zeigen die Verhältnisse, die oben vom Acetylaneurin beschrieben wurden, noch deutlicher gegenüber den Kurven vor der Lähmung der Esterase. Nach der Lähmung ist selbst mit 2,5 mg keine Blutdruckwirkung zu erzielen, während vorher letztere wirksam war. Oberhalb dieser Grenze liegende Dosen zeigen einen völlig anders gearteten Wirkungsverlauf. Hier ist besonders der ganz allmähliche Abfall zu bemerken und außerdem die wesentlich verlängerte Wirkungsdauer, die bei Weitererhöhung der Konzentration noch mehr zunimmt.

Nach diesen Ergebnissen kann mit Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die Cholinesterase auf das Acetyl- und Benzoylaneurin einwirkt und dadurch die Blutdrucksenkung hervorgerufen wird. Wieweit die Spezifität der Cholinesterase dadurch beeinträchtigt wird, werden weitere hydrolytische Spaltungsversuche mit cholinesterasehaltiger Substrate ergeben. Die teilweise unterschiedlichen Versuchsergebnisse von H. Süllmann und H. Birkhauser, L. Massart und R. Dufait deuten vielleicht darauf hin, daß es sich um zwei verschiedene Esterasen handelt. Auch hier werden weitere Versuche eine entsprechende Klärung geben.

Zusammenfassung.

1. Die Blutdrucksenkung bei der Katze, die durch Acetyl- und Benzoylaneurin hervorgerufen wird, wird durch Atropin nicht aufgehoben.

2. Acetylaneurin und Benzoylaneurin werden durch die Cholinesterase verseift.

3. Nach Lähmung der Cholinesterase durch Gynergen wird die Blutdruckwirkung von Acetyl- und Benzoylaneurin bei niederen Konzentrationen aufgehoben, bei steigender Konzentration tritt eine Herabsetzung der Wirkungsintensität, aber Verlängerung der Wirkungsdauer ein.

Am Schlusse meiner Arbeit sei es mir vergönnt, Herrn Prof. Kuhn für die Überlassung der Präparate Acetylaneurin und Benzoylaneurin meinen Dank auszusprechen.

Das Acetylcholin wurde mir für meine Versuche freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche, Berlin, und das Gynergen von der Firma Sandoz, Nürnberg, überlassen.

Aus dem Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie der Universität Breslau. (Direktor: Prof. Dr. O. Eichler.)

Über die Wirkung einmaliger Coffeininjektionen auf Mineralausscheidung und Harnmenge.

Von

Hubert Vollmer.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Dezember 1939.)

Zahlreiche Untersuchungen über die bekannte diuretische Wirkung der Purinkörper haben gezeigt, daß nicht nur die Harnmenge, sondern auch die Ausscheidung von Salzen vermehrt wird. Bei diesen Untersuchungen wurde die Ausscheidung des Chlors des öfteren, die Ausscheidung von Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium und Phosphat nur vereinzelt geprüft. Systematische Untersuchungen der Beeinflussung des Mineralhaushaltes liegen nicht vor[1]. Die Tatsache, daß die Änderung der Mineralausscheidung der Änderung der Harnmenge häufig nicht parallel ging, läßt aber gerade von derartigen systematischen Untersuchungen wesentliche Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus erwarten.

Bei der Betrachtung der möglichen extrarenalen Faktoren wird man besonders die Verschiebung der Mineralstoffe aus den Geweben ins Blut beachten, die der Wasserverschiebung nicht parallel zu gehen braucht[2]. Prinzipiell erscheinen dann die bisher veröffentlichten Untersuchungen über die Purinkörperdiurese zur Klärung der Wirkung auf die Mineralausscheidung ungeeignet, da die Veränderungen nur über wenige Stunden, bestenfalls über einen Tag geprüft wurden. Mineralverschiebungen aber werden kaum innerhalb weniger Stunden abgeschlossen sein, vielleicht nicht einmal ihren Höhepunkt erreicht haben. Außerdem könnten durch die primären Veränderungen Gegenregulationen ausgelöst und auch damit Schwankungen der Mineralausscheidung über längere Zeit bewirkt werden.

Wir haben deshalb bei unseren Untersuchungen die Wasser- und Salzdiurese stets über mehrere Tage nach den Coffeininjektionen im Bilanzversuch geprüft. Gelegentlich der Erörterung der Technik des Diuresevers uchs[3] wurde bereits kurz mitgeteilt, daß die subcutane Injektion von Coffein bei der Ratte tatsächlich Diuresesteigerungen und Vermehrungen

[1] Siehe Eichler: Kaffee und Coffein, Berlin 1938, und hinsichtlich der älteren Literatur: Bock: Hefters Handb. exper. Pharmakol. **2**, I, 554, Berlin 1920. — [2] Sakata: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **105**, 11 (1924) (Diuretinversuche am Kaninchen). — [3] Vollmer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 484 (1939).

der Salzausscheidung über Tage bewirkt. Derartige langanhaltende Wirkungen ergaben sich auch beim Kaninchen[4]. — Der erste Teil unseres Arbeitsprogramms umfaßt im wesentlichen die Prüfung des Verhaltens der Harnmenge und der Ausscheidung von Kalium, Natrium und Chlor an Ratten bei einer Normaldiät, entsprechende Prüfungen bei Diäten mit weitgehend variiertem Gehalt an einzelnen Mineralstoffen und die Untersuchung der Verhältnisse bei gewöhnten Tieren. Die folgenden Ausführungen berichten über die Wirkung einmaliger subcutaner Coffeininjektionen bei Normaldiät, d. h. bei Zufuhr reichlicher Mengen der verschiedenen Mineralstoffe.

Die nach den Coffeininjektionen auftretenden Veränderungen sind nicht ohne weiteres als Wirkungen des Coffeins anzusehen. In Versuchen mit destilliertem Wasser wurde gezeigt[5], daß die Injektion an sich charakteristische Wirkungen auf die Wasser- und Salzausscheidung besitzt, die über einen Zeitraum von 3--4 Tagen stärkere Schwankungen bedingt. Diese Wirkung muß bei der Beurteilung der nach Coffeininjektion beobachteten Änderungen in Rechnung gestellt werden.

I. Methodik[6]).

Diät. Verwendet wurde eine Diät, bei der in Versuchen von Miller[7] junge Ratten optimale Gewichtsentwicklung zeigten.

Das Futter wurde folgendermaßen hergestellt: 13,5 g Salzgemisch (s. unten), 90 g Casein, 10 g Trockenhefe, 372 g Stärke und 10 ccm Lebertran wurden im Mörser sorgfältig gemischt. 10 g Agar-Agar wurden in 1100 ccm Wasser gerade aufgekocht und die heiße Lösung unter ständigem Umrühren dem Pulver im Mörser zugefügt. Das pastenartige Gemenge wurde zur gleichmäßigen Durchmischung 20 Minuten mit dem Pistill bearbeitet, danach 10 Minuten durchgeknetet. Die gleichmäßige Durchmischung ergab sich aus vielfachen Mineralanalysen. Das fertige Futter bewahrten wir im Eisschrank auf. Der Gehalt an Trockensubstanz betrug 28—32% und lag im allgemeinen bei 30%. Bei dieser Diät ist eine weitere Wasserzufuhr nicht notwendig[8].

Das Salzgemisch bestand aus 40 Teilen NaCl, 62 Teilen $MgSO_4$, 41 Teilen Na_2HPO_4, 223 Teilen K_2HPO_4, 223 Teilen $Ca_2H_2(PO_4)_2 \cdot 4\,H_2O$, 57 Teilen Calcium lacticum und 27 Teilen Ferrum citricum.

Für die Herstellung des Futters wurden Stärke, Casein, Hefe usw. des Handels, also Materialien mit einem gewissen Gehalt an Mineralstoffen verwendet, so daß das Futter analytisch kontrolliert werden mußte.

Versuchsanordnung. 200—300 g schwere, männliche Ratten erhielten über längere Zeit unser Futter, und zwar im allgemeinen 40 g, in einigen Versuchen 45 g/Tag. Selbst große Ratten fraßen häufig 50 g, 200 g schwere Tiere 45 g nicht auf. In den nachstehend beschriebenen Serien wurden die Tiere zur Erzielung

[4] Vollmer u. Grünig: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 539 (1939). — [5] Vollmer u. Irmer: Ebenda **193**, 474 (1939). — [6] Spezielle Ausführungen zur chemischen Methodik werden nur in dieser Arbeit gebracht. Die Angaben gelten auch für die übrigen Arbeiten. — [7] Miller: J. biol. chem. (Am.) **55**, 45 u. 61 (1923). — [8] In einer Reihe von Versuchen wurde den Ratten die Möglichkeit weiterer Flüssigkeitsaufnahme gegeben. Die Gewichtskontrolle der üblichen Trinkgefäße ergab lediglich die Verdunstungsverluste.

eines Gleichgewichtes 5—7 Tage mit abgewogenen Futtermengen vorgefüttert. Dieser Vorperiode folgte eine Versuchsperiode von 5—16 Tagen, in der die Normalwerte ermittelt wurden[9]. Der Vorperiode folgte dann eine Versuchsperiode mit ein- bis dreimaligen Gaben von Coffein bzw. destilliertem Wasser. Für die Coffeininjektionen wurde eine 1%ige Lösung von Coffeinum purum verwendet.

Die Tiere blieben während der ganzen Versuchsdauer einzeln in den Versuchsgefäßen (Diuresekäfige aus Glas mit doppeltem Boden aus Drahtgeflecht) und wurden jeden Tag zur gleichen Zeit in einen anderen Käfig umgesetzt. Das Gewicht wurde während der Versuche im allgemeinen nur einmal, außerdem am Anfang und am Ende der Versuchsperiode bestimmt, weil Harnverluste beim Wägen möglich sind. Auch während der Injektionen wurden die Ratten nicht aus den Käfigen entfernt.

Chemische Methodik.

Untersuchung des Harns. Nachdem die Harnmenge abgelesen war, wurden die Harne zur Erleichterung der Umrechnung (bei der Größe des Versuchsmaterials wesentlicher Zeitgewinn) mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Dabei wurden zur Konservierung einige Tropfen konzentrierter Salpetersäure zugegeben, weil die Harne jeweils bis zur Erledigung aller Analysen aufbewahrt wurden. 10 ccm wurden zur Chlorbestimmung nach Volhard (n/20—n/50 Lösungen) verwendet.

Zur Bestimmung von K und Na wurden 10 ccm der Harnverdünnung zunächst in größeren Reagensgläsern[10] aus Pyrexglas verascht[11]. Dabei erwies es sich nach zahlreichen andersartigen Versuchen als zweckmäßig, die Salpetersäure nicht dem Harn zuzusetzen (Spritzen bei der Veraschung), sondern zunächst den Harn auf dem Wasserbade zur Trockne zu dampfen. Danach wurden 2—3 ccm konzentrierte Salpetersäure zugegeben und nach Möglichkeit einige Stunden bis Tage stehengelassen. Wir empfehlen, die bei derartigen Untersuchungen anfallenden Harne möglichst bald zu verdampfen und möglichst lange mit der Säure stehen zu lassen, weil dadurch die eigentliche Veraschung außerordentlich abgekürzt werden kann. Außerdem ermöglicht dieses Vorgehen weitgehende Ersparnis an Perhydrol, die bei großen Serien ins Gewicht fällt. Kurz vor der Veraschung wurden dann jedem Röhrchen 3 Tropfen Perhydrol zugefügt. Unter Umständen ist es erforderlich, gegen Ende der Veraschung nach kurzem Abkühlen (!) an der Luft nochmals etwas Salpetersäure und Perhydrol zuzufügen. Die Veraschung erfolgte auf Sandbädern, wobei wir jedesmal rund 30 Röhrchen zusammen ansetzten. Durch kleine Perlen aus Pyrexglas kann das Stoßen der Flüssigkeit völlig ausgeschaltet werden. Da wir in der ersten Zeit der Untersuchung Verluste durch Verspritzen hatten, haben wir die Veraschungen dauernd beobachtet.

Bei der Verarbeitung der Aschen und bei der Na-Bestimmung lehnten wir uns an die Angaben von Mond und Netter[12] an. Allerdings ist es unmöglich, die Asche in Wasser aufzunehmen, weil größere Mengen von Kalium in der Asche in unlöslicher Form enthalten sind und auch im Verlauf mehrerer Tage nicht in Lösung gehen. Wir haben daher die Aschen mit 1%iger Salzsäure auf 10 ccm gelöst, wobei wir

[9] Es sei erwähnt, daß diese Zeiten nur bei der angegebenen Diät ausreichend sind. Bei Verminderung oder Vermehrung einzelner Mineralstoffe, wie wir sie in anderen Untersuchungsreihen durchführten, waren zum Teil Vorperioden von mehr als 50 Tagen bis zur einwandfreien Einstellung des Gleichgewichts erforderlich. — [10] Die käuflichen, ziemlich dünnen Röhrchen werden bei wiederholter Benutzung sehr leicht brüchig. Wir haben uns deswegen vom Glasbläser dickere Röhrchen aus Pyrex-Glasrohren schmelzen lassen. — [11] Bei andersartigen Diäten mit wenig Mineralstoffen ist unter Umständen mehr Harn erforderlich (Vorversuche notwendig). — [12] Mond u. Netter: Pflügers Arch. **230**, 42 (1932).

zunächst 5 ccm zugaben, dann vorsichtig erwärmten (nicht immer nötig) und rasch die restlichen 5 ccm zufügten. Von dieser Aschenlösung wurden 0,5—1,0 ccm zur Kaliumbestimmung entnommen. Der ganze Rest oder ein aliquoter Teil wird für die Na-Bestimmung verwendet. Dabei wird zunächst mit einer im Vorversuch ermittelten Ammoniakmenge neutralisiert, danach zu Ausfällung von Sulfat und Phosphat mit 0,6 ccm einer 20%igen $BaCl_2$-Lösung und mit 2 ccm einer gesättigten $Ba(OH)_2$-Lösung versetzt, filtriert, nachgewaschen, der Überschuß des Ba mit kalt gesättigter $(NH_4)_2CO_3$-Lösung (3 ccm) ausgefällt, nochmals filtriert und nachgewaschen. Die gesamte Lösung wird zur Na-Bestimmung verwendet, und zwar wird sie zunächst auf 2—4 ccm eingedampft. Die Angabe von Mond und Netter, daß 2 ccm verwendet werden sollen, beruht darauf, daß diese Autoren von der kolorimetrischen Methode von Barrenscheen und Messiner ausgingen.

Die Na-Bestimmung wurde gravimetrisch durch Fällung als Natriumuranylzinkacetat durchgeführt. Bei geringen Na-Mengen würde man nach unseren Vorversuchen zweifellos mit weniger als 12 ccm Reagens auskommen und Uranylacetat sparen. Wir sind bei dieser Menge lediglich geblieben, weil mit stärkeren Schwankungen der Na-Ausscheidung gerechnet wurde. Beim Nachwaschen des Niederschlages mit einer gesättigten alkoholischen Lösung des Natriumuranylzinkacetats (Niederschlag) wurde statt einer Lösung in Äthanol eine Lösung in einem mit Holzgeist vergälltem Alkohol verwendet, den wir nach Destillation mit geglühtem $CuSO_4$ entwässerten. Der zum Trocknen des Niederschlages verwendete Äther wurde über $CaCl_2$ aufbewahrt. Die Filtertiegelchen (Schott & Gen. G 3!) wurden bis zu dreimal verwendet, danach mit Chromschwefelsäure gereinigt und das Leergewicht neu bestimmt.

Die Bestimmung des Kaliums erfolgte titrimetrisch nach der Mikromethode von Tisdall und Kramer, wobei das K als Kaliumhexanitrokobaltiat gefällt, der Niederschlag auf der Zentrifuge gewaschen und mit Permanganat zerlegt und titriert wird. Die benötigte Menge Aschenlösung ergibt sich aus der zu erwartenden K-Menge und aus der Größe der verwendeten Zentrifugengläser. Bei zu großen K-Mengen in der Analyse (0,5 mg und mehr) entsteht ein Fehler dadurch, daß auch bei viermaligem Waschen auf der Zentrifuge Reagens im Niederschlag bleibt und damit die Werte zu hoch werden. Man erkennt das sehr deutlich an einer vom Reagens gefärbten Zone über dem Niederschlag, wenn man diesen einige Stunden probeweise mit der Flüssigkeit stehenläßt. Dieser Fehler ist größer in spitz endenden Zentrifugenröhrchen mit dementsprechend dickerer Niederschlagsschicht als bei breiten Zentrifugenröhrchen. Unter Umständen wird man bei größeren Niederschlagsmengen fünfmal waschen. Weiterhin kommt man bei zu großen Kaliummengen bei der Titration mit dem Zentrifugenglas nicht aus. Beim Umgießen in Bechergläschen entstehen Fehler schon dadurch, daß der Blindwert (zur sichtbaren Verfärbung benötigte Permanganatmenge) sich ändert. Umgekehrt sind bei zu geringem K-Gehalt (0,05 mg und weniger in der Analyse) Fehler dadurch möglich, daß der Niederschlag nicht so fest im Zentrifugenröhrchen haftet. Dieser Fehler kann durch schärferes Zentrifugieren und äußerst vorsichtiges Absaugen der Waschwässer beherrscht werden, da der geringe K-Gehalt an der Größe des Niederschlags nach dem ersten Zentrifugieren erkannt wird. Wir haben nach dem Zufügen des Reagens zur Aschenlösung 20—30 Minuten stehenlassen und für dieses Vorgehen den bei Kramer und Tisdall angegebenen Faktor 0,071 für die Errechnung des K-Gehalts aus der verbrauchten n/100 Permanganatlösung bestätigt

Untersuchung der Faeces. Während bei der Untersuchung der Harne in einem sehr großen Teil der Versuche die Tagesharne der einzelnen Tiere für die Bestimmung des K und Na aufgearbeitet wurden (beim Cl stets Untersuchung der

Einzelharne), wurden bei den Faeces stets Gemische der Tagesfaeces zusammengehöriger Tiere[13] verwendet.

Die Tagesfaeces wurden einzeln oder gruppenweise vereinigt im Trockenschrank getrocknet, dann gewogen. 1 g der fein verriebenen Trockenfaeces wurde dreimal mit Wasser ausgekocht, der praktisch chlorfreie Rückstand unter Zufügung von HNO_3 verkocht. Die verschiedenen Auszüge wurden vereinigt und auf 100 ccm aufgefüllt[14]. Da die Faeces nur geringe Cl-Mengen enthalten, wurden für die Cl-Bestimmung 50 ccm verwendet. Zu dieser Menge wurden 5 ccm n/50 $AgNO_3$-Lösung gegeben und unter Zufügung von konzentrierter HNO_3 und von $KMnO_4$-Lösung klargekocht (Prinzip des „offenen Carius"). Nachdem der größte Teil der HNO_3 abgedampft war, wurde unter Zufügung von Wasser längere Zeit weitergekocht, schließlich mit n/50 Rhodanidlösung titriert. — Für die Bestimmung des K und Na wurden 20 ccm der Ausgangslösung wie bei der Untersuchung der Harne verascht und aufgearbeitet.

Untersuchung des Futters. Für die Bestimmung des Cl-Gehalts wurde das getrocknete, fein zerriebene Futter mit dünner NaOH homogenisiert, dann mit HNO_3 schwach angesäuert und n/50 $AgNO_3$-Lösung zugefügt, schließlich wie bei der Untersuchung der Faeces unter Zusatz von konz. HNO_3 klargekocht. Zur Entfärbung waren kleine Mengen $KMnO_4$ notwendig. Für die Bestimmung des K und Na wurde in dem von Rossenbeck[15] angegebenen Apparat mit rauchender HNO_3 verascht. Die Veraschungsdauer läßt sich gering halten, wenn man nicht mehr als 1 g Analysenmaterial verwendet und vor dem Zufügen der Säure bei zusammengesetztem Apparat möglichst weitgehend ankohlt.

Auswertung.

Bei der Auswertung wurden in üblicher Weise die Streuungen berechnet. Die Haupttabellen enthalten die Streuungen der Durchschnittswerte und der Differenzen immer dann, wenn Einzelwerte zusammengefaßt wurden. Bei den an Sammelharnen gewonnenen Werten dient als Grundlage des Vergleichs die Streuung des Kollektivs der Normalwerte. Die Tabellen zeigen, daß bei unseren entscheidenden Befunden die Differenzen das Dreifache ihrer Streuung überschreiten. Allerdings wird man in Versuchen, wie wir sie durchführen, auch Differenzen für beweisend halten, die innerhalb des Dreifachen ihrer Streuung liegen, wenn an aufeinanderfolgenden Tagen gleichsinnige Veränderungen auftreten. Die Berechtigung dazu läßt sich im übrigen exakt begründen. Unter der Voraussetzung, daß es sich um Gaußsche Verteilung handelt, die durch Mittelwert und Streuung definiert ist, haben wir in einigen Serien die Wahrscheinlichkeit errechnet, daß solche Differenzen echt sind.

[13] Die einzelnen Versuchsserien umfaßten bis zu 10 Tieren. Diese verteilten sich auf 2 Gruppen. Entweder diente eine Gruppe als Kontrolle oder es befanden sich wenigstens beide Gruppen in verschiedenen Versuchsstadien. Eine derartige Sicherung ist notwendig, weil Änderungen unabhängig von den Injektionswirkungen vorkommen können. Sie betreffen allerdings nur die Harnmenge. Über eine derartige Beobachtung (Änderung der Harnmenge bei Temperaturänderung) siehe Vollmer[3]. — [14] Die angegebenen Mengenverhältnisse usw. ergaben sich als zweckmäßig während der Versuche. Verwendung von mehr Faeces oder geringeren Flüssigkeitsmengen und erschöpfende Extraktion nur mit Wasser führten zu Schwierigkeiten, da die Faecesauszüge beim Erkalten gelierten (unverdauter Agar-Agar) oder unangenehme Niederschläge bildeten. Bei größeren Mengen Faeces wird die Dauer der Veraschungen unter Umständen um Stunden verlängert. — [15] Rossenbeck: Biochem. Z. **208**, 428 (1929).

II. Mineralgehalt der Faeces und Bilanz.

Aus Untersuchungen an verschiedenen Tierarten ist vor allem für Natrium und Chlor bekannt, daß mit den Faeces nur geringe Anteile der zugeführten Mengen ausgeschieden werden. So fanden Mitchell und Carman [16] an Ratten bei Zufuhr von 3—5 mg Cl in einigen Versuchen in den Faeces überhaupt kein Cl wieder, in der Mehrzahl der Versuche 0,1—0,3 mg, bei Zufuhr von 66—91 mg waren in den Faeces 0,7—1,7 mg enthalten. Natrium wurde bei Zufuhr von 4—5 mg in Mengen von 0,3—0,6 mg, bei Zufuhr von 49—62 mg in Mengen von 1,2—2,6 mg mit dem Kot ausgeschieden.

Unsere Werte liegen beim Cl in der gleichen Größenordnung, sind aber beim Na höher. Die an einer großen Zahl von Faeces (der Normaltage) ermittelten Werte sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Die im Vergleich zu den Befunden von

Tabelle 1. Gehalt der Faeces an Chlor, Natrium und Kalium.

Untersuchter Bestandteil	Zufuhr in mg	Ausscheidung in mg
Chlor	20,99—21,2	0,2 — 0,91
„	25,2	0,67— 2,34
Natrium	17	1,33— 4,53
„	21,6	2,9 — 6,1
Kalium	61,7—64,5	3,9 —10,7

Mitchell und Carman höheren Werte beim Na und die relativ hohen Werte beim K dürften sich daraus erklären, daß der in unserem Futter enthaltene und — wie erwähnt — unverdaut wieder ausgeschiedene Agar-Agar die Resorption der schwer löslichen Phosphate hemmt.

Im Hinblick auf die Fragestellung der Untersuchung sind die Fragen wichtig, ob der Mineralgehalt der Faeces durch Coffeingaben beeinflußt wird und wieweit sich die Tiere am Zeitpunkt der Coffeininjektion im Mineralgleichgewicht befanden.

Über die Verhältnisse nach Coffeininjektion gibt die Tabelle 2 Aufschluß, in der die für Cl, Na und K in einem Versuch mit destilliertem Wasser und 4 Ver-

Tabelle 2. Chlor, Natrium und Kalium in den Faeces an den Tagen nach subcutanen Gaben von destilliertem Wasser oder Coffein. Mengen in mg.

Untersuchter Bestandteil	Bezeichnung	Pro 100 g verabfolgt	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
Chlor	I	0,25 Aqua dest.	0,66	0,55	0,34	0,85	0,87	
	II	2,5 mg Coffein	0,37	0,43	0,39	0,56	0,60	
	III	5,0 „ „	0,62	0,49	0,87	0,45		
	IV	5,0 „ „	0,31	0,48	0,67	0,39	0,55	0,44
	V	10,0 „ „	0,44	0,33	0,65	0,35	0,43	0,39
Natrium	I	0,25 Aqua dest.	4,3	3,9	3,8	3,2	4,1	
	II	2,5 mg Coffein	3,2	4,5	4,7	3,9	4,3	
	III	5,0 „ „	3,9	2,7	5,1	5,3		
	IV	5,0 „ „	4,7	3,9	5,1	3,7	4,1	4,0
	V	10,0 „ „	3,2	4,9	4,8	5,2	4,7	3,9
Kalium	I	0,25 Aqua dest.	6,7	5,3	5,9	7,1	4,9	
	II	2,5 mg Coffein	6,5	10,2	7,3	6,5	9,1	
	III	5,0 „ „	6,9	8,3	7,2	8,3		
	IV	5,0 „ „	6,9	6,9	8,7	9,6	5,2	5,3
	V	10,0 „ „	8,5	7,6	9,2	9,4	9,2	8,7

[16] Mitchell u. Carman: J. biol. Chem. (Am.) **68**, 165 (1926).

suchen mit Coffein ermittelten Werte zusammengestellt sind. Die Zahlen zeigen eindeutig, daß die Ausscheidung der genannten Mineralstoffe mit dem Kot durch die Coffeingaben bzw. durch die Injektion an sich nicht beeinflußt wird. Man kann sich somit bei der Prüfung der Coffeinwirkung auf die Untersuchung des Harnes beschränken. Aus Zufuhr und Ausscheidung im Harn ergibt sich vor allem ein Urteil über die wichtige Frage des Gleichgewichtes.

Bei dem Material dieser Arbeit kann die Bilanz auf Grund der Faecesanalysen mehrerer Tierserien festgelegt werden. In Untersuchungen wie der vorliegenden ist es unmöglich, die Verhältnisse schon während der eigentlichen Tierversuche zu überblicken, da die Arbeitszeit durch laufende Arbeiten (Herstellung des Futters, Abwägen der Futterportionen, Sammeln, Trocknen und Wägen der Faeces, Cl-Titrationen usw.) weitgehend eingeschränkt ist und die Bestimmung des K und Na (Veraschung, Vorbereitung der eigentlichen Analyse beim Na usf.) nicht entfernt mit dem Anfall an Untersuchungsmaterial Schritt hält. Die in kurzer Zeit zu ermittelnde Cl-Bilanz sagt nichts über die Verhältnisse beim K und Na aus, da sich der Cl-Stoffwechsel sehr viel rascher ins Gleichgewicht einstellt. In sämtlichen

Tabelle 3. Bilanz für die 10 Normaltage einer Tierserie.
(1—6. Tag: 10 Tiere; 7—10. Tag: 5 Tiere.)

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
I. Chlor: Zufuhr (analytisch ermittelt): 21,14 mg.										
Harn-Cl	14,69*	21,24	19,73	19,74	20,18	18,85	19,34	19,14	19,12	20,00
Faeces-Cl	0,55	0,49	0,49	0,48	0,41	0,58	0,44	0,82	0,75	0,62
Gesamt	15,24	21,73	20,21	20,22	20,59	19,43	19,78	19,96	19,87	20,62
= % der Zufuhr	72,1	102,8	95,6	95,7	97,4	91,9	93,6	94,4	94,0	97,5
II. Natrium: Zufuhr (analytisch ermittelt): 21,6 mg.										
Harn-Na	12,2*	15,5	15,7	15,3	15,1	14,7	22,7	12,3	15,3	16,0
Faeces-Na	6,1	5,1	4,6	4,5	4,2	6,1	2,9	5,3	4,6	4,3
Gesamt	18,3	20,6	20,3	19,8	19,3	20,8	25,6	17,6	19,9	20,3
= % der Zufuhr	84,7	95,4	94,0	91,7	89,4	96,3	118,5	81,5	92,1	94,0
III. Kalium: Zufuhr (analytisch ermittelt): 64,5 mg.										
Harn-K	51,1*	59,2	52,2	55,2	57,7	56,2	56,1	46,9	50,0	53,5
Faeces-K	6,1	8,4	10,7	9,6	6,7	8,0	5,6	8,3	7,2	7,3
Gesamt	57,2	67,6	62,9	64,8	64,4	64,2	61,7	55,2	57,2	60,8
= % der Zufuhr	88,7	104,8	97,5	100,5	99,9	99,5	95,7	85,6	88,7	94,3

* Die niedrigen Werte am 1. Tag beruhen auf Harnverlust beim Wägen der Tiere.

11 Versuchsgruppen der Tabellen 4—7 entspricht die Cl-Ausscheidung an den Normaltagen der Zufuhr, während K und Na sich bei 4 dieser 11 Gruppen (2, 5, 6 und 10) noch nicht eingestellt hatten.

Über die Bilanz bei den 7 Versuchsgruppen mit K- und Na-Gleichgewicht gibt als Beispiel die Tabelle 3 Aufschluß, die die 10 analysierten Normaltage einer Tierserie umfaßt. Eine Besprechung dieser Tabelle erübrigt sich.

III. Die Wirkung des Coffeins auf Harnmenge, Harn-Cl, Harn-Na und Harn-K.

Die Untersuchungen umfassen einen Dosierungsbereich von 1—10 mg pro 100 g. Entsprechend der sehr großen Zahl von Versuchen wird auf die Wiedergabe von Einzelwerten verzichtet. In den Tabellen 4—7, die den größten Teil des Materials umfassen, sind zwecks Raumersparnis

nicht die ermittelten Durchschnittswerte angegeben, sondern nur die Differenzen gegenüber den Normalwerten mit ihren Streuungen. Die Durchschnittswerte sind unschwer zu ermitteln. Dort, wo die Streuungen fehlen, werden Sammelharne analysiert. Außerdem sind in den mit b bezeichneten Tabellen die prozentualen Änderungen zusammengefaßt. Bei den Normalwerten ist in den Tabellen jeweils die Zahl der zugrunde liegenden Einzelwerte angegeben. Der gleiche Normalwert für mehrere Gruppen kommt dadurch zustande, daß gleiche Normalwerte dieser Gruppen zusammengefaßt werden konnten oder daß an den gleichen Tieren mehr als ein Versuch durchgeführt wurde. Letzteres ist seltener der Fall. Anders als im vorstehenden Abschnitt sind sämtliche Werte für Cl, Na oder K in Millimol ausgedrückt.

Da die Coffeinwirkung jahreszeitliche Unterschiede (s. auch Hindemith[17]) aufweist, werden nachstehend die Winterversuche (Zeit der Tierversuche Dezember 1937 bis April 1938; September bis Dezember 1938) und die Sommerversuche (Juni-Juli 1938) getrennt dargestellt.

A. Winterversuche.

Beeinflussung der Harnmenge.

Wie früher[5] gezeigt wurde, muß die Wirkung der Injektion an sich in Rechnung gestellt werden.

Abb. 1 bringt deshalb die nach Injektion von destilliertem Wasser beobachteten Änderungen. Die nach Coffeininjektion erhobenen Befunde sind in den Tabellen 4a und b dargestellt. Diese zeigen folgendes:

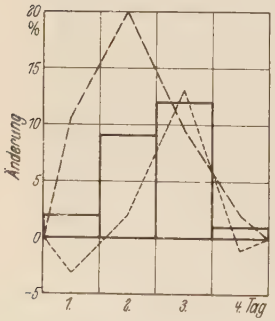


Abb. 1. Wirkung subcutaner Injektionen von destilliertem Wasser auf die Harnmenge an 4 Tagen nach der Injektion.
– Durchschnitt der Versuche mit sämtlichen Dosen.
— — — 1 ccm/100 g.
····· 0,1—0,5 ccm/100 g.

Bei der Dosis 1 mg/100 g (Gruppe 1) sind die Veränderungen geringer als die durchschnittlichen Veränderungen nach Injektion von destilliertem Wasser, doch zeigen zwei Wasserversuche der vorangegangenen Arbeit, daß eine Wirkung auf die Harnmenge nicht immer vorhanden sein muß. Die Dosis 1 mg/100 g ist somit wirkungslos.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Versuchen mit 2,5 mg/100 g (Gruppen 2—4). Hier sind die Harnvermehrungen am 3. Tage nach der Injektion nicht stärker als die nach Wasserinjektion beobachteten. Völlig eindeutige Coffeinwirkung aber stellen die bei zwei von drei Gruppen am 4. und 5. Tage beobachteten Steigerungen dar. In der Gruppe 4 handelt es sich bei den Steigerungen um rund 10 % am 4. und 5. Tage mit 92 und

[17] Hindemith: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 587 (1939).

99 % Wahrscheinlichkeit um eine Coffeinwirkung. Hinsichtlich der Beeinflussung der Wasserausscheidung über längere Zeit stellt somit die Dosis 2,5 mg/100 g die Grenzdosis dar.

Noch eindeutiger ist die Coffeinwirkung in den Gruppen 5—9, A und B, bei der Dosis 5 mg/100 g. Acht zum Teil beträchtliche Harnvermehrungen neben einer unbeträchtlichen Harnverminderung am 1. und 2. Tage ergeben eine Coffeinwirkung bereits zu dieser Zeit. 6 Gruppen weisen deutliche Harnvermehrung am 4. Tage, die 5 über 4 Tage hinaus geprüften Versuchsgruppen auch noch am 5. Tage auf. Selbst jenseits des 5. Tages finden sich noch Diuresesteigerungen.

Die Versuche mit 10 mg/100 g (Gruppen 10 und 11) bedürfen keiner Erörterung mehr. Mit höheren Dosen (15 und 20 mg/100 g) angesetzte Versuche mußten abgebrochen werden, da die Tiere nach der Injektion schlecht fraßen und Durchfälle bekamen[18].

Einmalige subcutane Injektionen von Coffein bewirken, wie die Werte der Tabelle 4a und b zeigen, Harnvermehrungen, die manchmal erst 1—2 Tage nach der Injektion auftreten, dann aber für mehrere Tage bestehenbleiben können.

Beeinflussung des Harnchlors.

Die hinsichtlich der Beeinflussung der Cl-Ausscheidung erhobenen Befunde sind in der Tabelle 5a und b, die für die Abgrenzung gegenüber der Injektionswirkung erforderlichen Daten in der Abb. 2 zusammengestellt.

Anders als bei der Harnmenge erwies sich bereits die Dosis 1 mg/100 g als wirksam. Die beträchtliche Cl-Verminderung des ersten Tages entspricht der Wirkung der Injektion an sich. Die Vermehrungen der Cl-Ausscheidung am 2., 3., aber auch noch am 4. Tage sind beträchtlich größer als die nach Wasserinjektion beobachteten. Das vermehrt ausgeschiedene Cl wird am 5. Tage wieder eingespart.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Dosen 2,5 mg und 5,0 mg/100 g. Die Senkung der Cl-Ausscheidung am 1. Tage ist nicht immer

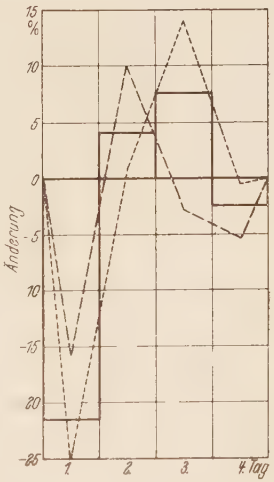


Abb. 2. Wirkung subcutaner Injektionen von destilliertem Wasser auf das Harn-Cl an 4 Tagen nach der Injektion.
□ Durchschnitt der Versuche mit sämtlichen Dosen.
— — — 1 ccm/100 g.
..... 0,1—0,5 ccm/100 g.

[18] Bei den Dosen 1—10 mg/100 g wurden Durchfälle niemals beobachtet (bisher mehr als 100 Versuche). Bei mehreren Versuchsgruppen war das Trockengewicht der am 1. Tage nach der Injektion ausgeschiedenen, normal geformten Faeces sogar vermindert. Es wurde nur das Trockengewicht bestimmt.

Tabelle 4a. Harnmengen

Versuchsgruppe	Normalwert	Zahl der Tiere	Coffein mg/100 g	Differ 1. Tag	2. Tag
1	15,6 ± 0,33[1]	10	1,0	− 1,0 ± 0,8	+ 0,4 ± 0
2	16,5 ± 0,53[2]	6	2,5	− 0,5 ± 1,0	+ 3,2 ± 1
3	19,4 ± 0,21[3]	5	2,5	+ 0,1 ± 2,01	+ 0,4 ± 0
4	wie 3	5	2,5	− 0,8 ± 0,83	+ 1,0 ± 1
5	14,0 ± 0,84[4]	3	5,0	+ 1,2	+ 1,0
6	12,5 ± 0,46[5]	4	5,0	+ 3,9 ± 0,79	+ 0,1 ± 0
A	wie 1	6	5,0	+ 0,2 ± 1,05	+ 5,8 ± 0
B	16,9 ± 0,12[6]	2	5,0	+ 5,1	+ 1,6
7	wie 3	5	5,0	− 0,3 ± 1,45	+ 0,6 ± 1
8	wie 3	4	5,0	− 2,1 ± 0,59	+ 2,1 ± 1
9	18,5 ± 0,26[7]	4	5,0	+ 0,7 ± 2,0	+ 3,0 ± 1
10	13,2 ± 0,113[8]	6	10,0	+ 4,2 ± 1,18	+ 3,6 ± 1
11	wie 3	5	10,0	− 0,3 ± 1,66	+ 0,8 ± 0

[1] 15 Werte. — [2] 153 Werte. — [3] 71 Werte. — [4] 9 Werte. — [5] 24 Werte. — [6] 24 Werte. — [7] 71 W

Tabelle 4b. Harnmengen nach einmaliger Coffeininjektion. Ergebnis.

Versuchsgruppe	Coffein mg/100 g	Änderung in % 1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
1	1,0	− 6,4	−	+ 5,1	−	−			
2	2,5	−	+ 19,4	+ 8,5	+ 17,6	+ 9,1	−		
3	2,5	−	−	+ 9,3	−	−	− 5,6	−	
4	2,5	−	−	+ 16,0	+ 9,3	+ 9,7			
5	5,0	+ 8,6	+ 7,1	+ 9,3					
6	5,0	+ 31,2	−	−	+ 31,2	+ 20,8			
A	5,0	−	+ 35,2	+ 25,5	+ 20,0	+ 18,2	+ 7,9	+ 7,3	
B	5,0	+ 30,2	+ 9,5	+ 18,3	+ 6,5	+ 11,2			
7	5,0	−	−	+ 13,9	+ 9,3				
8	5,0	− 10,8	+ 10,8	+ 13,4	+ 7,8	+ 11,3	+ 15,0		
9	5,0	−	+ 16,2	+ 16,2	+ 15,7	+ 27,0	−	+ 23,8	+ 14,7
10	10,0	+ 31,8	+ 27,4	+ 53,8	+ 43,2	+ 45,5	+ 28,8	+ 14,4	
11	10,0	−	+ 4,1	+ 17,0	+ 9,3	+ 6,7	+ 12,4	−	

vorhanden, außerdem sehr verschieden stark. Eindeutig sind die Cl-Vermehrungen am 2. und 3. Tage, die zum großen Teil über die reine Injektionswirkung beträchtlich hinausgehen, also eindeutig auf Coffein zu beziehen sind. In der Zeit vom 4. bis zum 7. Tage überwiegen ebenfalls die Steigerungen, wobei die Verhältnisse am 4. Tage nicht eindeutig sind. Bei der Wasserinjektion dagegen wird die Cl-Einsparung des ersten Tages in den nächsten Tagen rückgängig gemacht, so daß bereits am Ende des 3. Tages die Summe der gesamten Änderungen praktisch gleich 0 ist. Daß die Coffeinwirkung über diesen Vorgang weit hinausgeht, ist offensichtlich.

naliger Coffeininjektion.

über den Normalwerten

3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
0,8 ± 0,6	+ 0,2 ± 0,8	— 0,6 ± 0,77			
1,4 ± 0,84	+ 2,9 ± 0,77	+ 1,5 ± 1,08	+ 0,2 ± 1,08		
1,8 ± 1,33	— 0,2 ± 0,75	— 0,3 ± 0,9	— 1,1 ± 0,8	+ 0,1 ± 3,1	
3,1 ± 0,95	+ 1,8 ± 1,0	+ 1,9 ± 0,69			
+ 1,3					
0,1 ± 0,56	+ 3,9 ± 1,9	+ 2,6 ± 1,14			
4,2 ± 0,83	+ 3,3 ± 0,92	+ 3,0 ± 0,8	+ 1,3 ± 0,72	+ 1,2 ± 0,88	
+ 3,1	+ 1,1	+ 1,9			
2,7 ± 0,86	+ 1,8 ± 1,35				
2,6 ± 0,84	+ 1,4 ± 1,48	+ 2,2 ± 1,83	+ 2,9 ± 1,14		
3,0 ± 1,4	+ 2,9 ± 1,53	+ 5,1 ± 2,03	+ 0,3 ± 2,06	+ 4,4 ± 1,08	+ 2,7 ± 1,9
7,1 ± 1,18	+ 5,7 ± 0,6	+ 6,0 ± 1,36	+ 3,8 ± 1,46	+ 1,9 ± 1,64	
3,3 ± 0,69	+ 1,8 ± 1,33	+ 1,3 ± 1,17	+ 2,4 ± 1,16	+ 0,9 ± 1,25	

4 Werte.

Nach Injektion von 10 mg/100 g zeigte sich am 1. Tage die von den Wasserversuchen bekannte Cl-Verminderung. Die Steigerung der Cl-Ausscheidung am 2. und 3. Tage ist 2—4½mal so groß als die nach Wasserinjektion beobachtete. Auch am 5. Tage nach der Injektion bestand bei der Versuchsgruppe 10 noch beträchtliche (25 %), bei der Versuchsgruppe 11 deutliche (9 %) Cl-Vermehrung.

Auch die Cl-Ausscheidung läßt somit völlig eindeutig eine Coffeinwirkung über lange Zeit erkennen.

Beeinflussung des Harnnatriums.

Der Vergleich der in den Tabellen 6a und b zusammengestellten Untersuchungsergebnisse mit der Wirkung der Wasserinjektion (Abb. 3) ergibt keine Wirkung der Coffeindosis 1 mg/100 g.

In den 3 Versuchsgruppen mit der Dosis 2,5 mg/100 g fällt einmal das Fehlen einer eindeutigen Verminderung der Na-Ausscheidung am 1. Tage auf, wie sie in den Wasserversuchen beobachtet wurde. Wie die Ausscheidungssteigerungen der Tabelle 6b zeigen, beginnt die Wirkung auf die Na-Ausscheidung bei 2,5 mg pro 100 g.

Sehr deutlich ist die langanhaltende Beeinflussung dagegen bei 5 mg/100 g. An die Stelle der Na-Verminderung als Folge der Injektion an sich sind beträchtliche Na-Vermehrungen in 5 von 6 Versuchsgruppen getreten. Der 2. Tag nach der Injektion zeigt

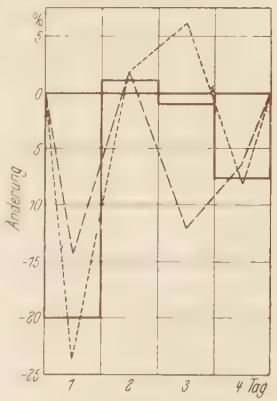


Abb. 3. Wirkung subcutaner Injektionen von destilliertem Wasser auf das Harn-Na an 4 Tagen nach der Injektion.
| Durchschnitt der Versuche mit sämtlichen Dosen.
— — — 1 ccm/100 g.
0,1—0,5 ccm/100 g.

Tabelle 5a. Chlorausscheidung

Versuchsgruppe	Normalwert	Zahl der Tiere	Coffein mg/100 g	Diffe 1. Tag	2. Tag
1	$0{,}54 \pm 0{,}01$[1]	10	1,0	$-0{,}09 \pm 0{,}03$	$+0{,}1 \pm$
2	$0{,}71 \pm 0{,}012$[2]	6	2,5	$+0{,}03 \pm 0{,}04$	$+0{,}22 \pm$
3	wie 1	5	2,5	$-0{,}04 \pm 0{,}02$	$-0{,}07 \pm$
4	wie 1	5	2,5	$-0{,}11 \pm 0{,}07$	$+0{,}05 \pm$
5	wie 2	3	5,0	$+0{,}04$	$+0{,}$
6	wie 2	4	5,0	$+0{,}19 \pm 0{,}06$	$+0{,}18 \pm$
7	wie 1	5	5,0	$-0{,}04 \pm 0{,}02$	$-0{,}02 \pm$
8	wie 1	4	5,0	$-0{,}11 \pm 0{,}06$	$-0{,}03 \pm$
9	$0{,}61 \pm 0{,}01$[3]	4	5,0	$-0{,}26 \pm 0{,}04$	$+0{,}06 \pm$
10	wie 2	6	10,0	$-0{,}07 \pm 0{,}09$	$-0{,}13 \pm$
11	wie 1	5	10,0	$+0{,}02 \pm 0{,}07$	$-0{,}14 \pm$

[1] 153 Werte. — [2] 93 Werte. — [3] 64 Werte.

Tabelle 5b. Chlorausscheidung nach einmaliger Coffeininjektion. Ergebnis.

Versuchsgruppe	Coffein mg/100 g	Änderung in % 1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
1	1,0	− 20,0	+ 22,0	+ 20,0	+ 6,7	− 22,2			
2	2,5	—	+ 31,0	+ 22,5	+ 9,9	+ 9,9	—		
3	2,5	− 7,4	− 12,9	—	− 20,0	+ 7,4	− 11,1	+ 7,4	
4	2,5	− 22,2	+ 11,1	+ 27,8	—	—			
5	5,0	—	+ 42,3	+ 36,6					
6	5,0	+ 8,5	+ 9,9	+ 5,6	+ 9,9				
7	5,0	− 7,4	—	+ 11,1	—				
8	5,0	− 20,4	—	+ 31,5	− 5,6	+ 24,1	+ 15,0		
9	5,0	− 42,6	+ 9,8	+ 23,0	+ 11,5	+ 9,8	− 13,1	+ 26,2	—
10	10,0	—	− 18,3	+ 45,1	+ 19,7	+ 25,4	—		
11	10,0	—	− 26,0	+ 24,0	+ 18,5	+ 9,3	—	—	

kein einheitliches Bild (2 starke Vermehrungen und 2 starke Verminderungen). Die Wirkung wird weiterhin durch 5 positive Werte am 4.—7. Tage demonstriert.

In den Versuchsgruppen mit 10 mg/100 g ist zunächst bemerkenswert die Na-Verminderung am 2. Tage, d. h. zur gleichen Zeit, in der einige 5-mg-Versuche ebenfalls Verminderungen zeigten. Dagegen findet sich am 1. und vom 3. bis zum 7. Tage nach der Coffeininjektion eine so starke Vermehrung der Na-Ausscheidung, daß die Tiere am Ende der Versuchsperiode mehr als eine Tagesration Na zuviel ausgeschieden haben.

Durch die subcutane Coffeininjektion wird somit auch die Na-Ausscheidung über mehrere Tage eindeutig vermehrt.

Beeinflussung des Harnkaliums.

Tabelle 7a und b (Coffeinversuche) und Abb. 4 (Wirkung der Injektion an sich) zeigen folgendes:

maliger Coffeininjektion.

über den Normalwerten

3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
),09 ± 0,02	+0,03 ± 0,03	−0,1 ± 0,02			
),16 ± 0,03	+0,07 ± 0,03	+0,07 ± 0,05	0 ± 0,03		
) ± 0,02	−0,1 ± 0,03	+0,04 ± 0,03	−0,06 ± 0,02	+0,04 ± 0,03	
,16 ± 0,02	−0,01 ± 0,05	0 ± 0,03			
+ 0,26					
,28 ± 0,04	+0,06 ± 0,06				
,06 ± 0,04	+0,04 ± 0,06				
),17 ± 0,06	−0,03 ± 0,04	+0,13 ± 0,06	+0,07 ± 0,04		
,14 ± 0,05	+0,07 ± 0,04	+0,06 ± 0,08	−0,08 ± 0,05	+0,16 ± 0,04	+0,01 ± 0,07
),32 ± 0,15	+0,14 ± 0,03	+0,18 ± 0,08	+0,03 ± 0,03		
),10 ± 0,03	+0,05 ± 0,02	+0,02 ± 0,06	−0,02 ± 0,04	+0,03 ± 0,05	

Wie hinsichtlich der Beeinflussung des Harn-Cl wurde bereits bei der kleinsten Dosis (1 mg/100 g) eine Wirkung beobachtet. Die K-Vermehrungen des 2. und 3. Tages sind zwar nicht stärker als nach Wasserinjektion, doch weisen auch der 1. und 4. Versuchstag beträchtliche K-Steigerungen auf.

Eindeutig ist trotz des bei den 3 Versuchsgruppen verschiedenartigen Verlaufs die über mehrere Tage anhaltende Vermehrung der K-Ausscheidung durch 2,5 mg/100 g.

Bei der Dosis 5 mg/100 g zeigen sich gewisse Besonderheiten. Die K-Ausscheidung ist bei der Mehrzahl der Versuchsgruppen am 1. Tage nicht vermehrt, sondern vermindert. Dann folgen z. T. sehr starke Steigerungen am 2. und 3. Tage und mit einer Ausnahme am 4. und 5. Tage. Auffallend ist danach eine K-Verminderung um 50 % neben einem praktisch normalen Wert am 6. Tage nach der Injektion. Die über mehr als 6 Tage geprüfte Versuchsgruppe 9 weist auch am 7. und 8. Tage noch eine K-Vermehrung auf.

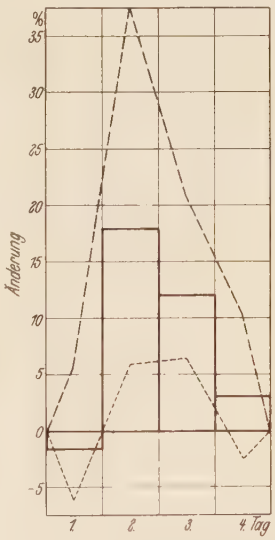


Abb. 4. Wirkung subcutaner Injektionen von destilliertem Wasser auf das Harn-K an 4 Tagen nach der Injektion. | Durchschnitt der Versuche mit sämtlichen Dosen. — — — 1 ccm/100 g. ..... 0,1—0,5 ccm/100 g.

Die anfängliche negative Phase findet sich auch hier in den Versuchen mit 10 mg 100 g. Sie ist in der Versuchsgruppe 11 ebenso vorhanden wie in der Versuchsgruppe 10, kommt aber in der Tabelle 7b nicht zum Ausdruck, da bei der Auswertung der an Sammelharnen erhobenen Befunde nicht die Streuung des Durchschnittswertes des Normalwertes, sondern die Streuung des Kollektivs zugrunde gelegt wurde. Die Steige-

Tabelle 6a. Natriumausscheid

Versuchsgruppe	Normalwert	Zahl der Tiere	Coffein mg/100 g	Differ 1. Tag	2. Tag
1	0,63 ± 0,01[1]	10	1,0	− 0,06 ± 0,18	+ 0,01 ±
2	0,36 ± 0,014[2]	6	2,5	+ 0,13 ± 0,06	+ 0,14 ±
3	0,63 ± 0,07[3]	5	2,5	− 0,06	+ 0,0
4	wie 3	5	2,5	− 0,02	+ 0,0
5	wie 2	3	5,0	+ 0,14	+ 0,2
6	wie 2	4	5,0	+ 0,07 ± 0,06	+ 0,08 ±
7	wie 3	5	5,0	+ 0,16	− 0,2
8	wie 3	4	5,0	+ 0,02	+ 0,0
9	0,65 ± 0,07[4]	4	5,0	+ 0,37	− 0,2
10	wie 2	6	10,0	+ 0,2 ± 0,49	− 0,07 ±
11	wie 3	5	10,0	+ 0,37	− 0,4

[1] 32 Werte. — [2] 88 Werte. — [3] 32 Werte; wie 1, aber Streuung des Kollektivs. — [4] 16 Werte.

Tabelle 7a. Kaliumausschei

Versuchsgruppe	Normalwert	Zahl der Tiere	Coffein mg/100 g	Diffe 1. Tag	2. Tag
1	1,42 ± 0,02[1]	10	1,0	+ 0,15 ± 0,08	+ 0,26 ±
2	0,69 ± 0,03[2]	6	2,5	+ 0,52 ± 0,16	+ 0,29 ±
3	1,42 ± 0,13[3]	5	2,5	+ 0,01	+ 0,6
4	wie 3	5	2,5	− 0,05	0
5	wie 2	3	5,0	+ 0,44	+ 0,6
6	wie 2	4	5,0	− 0,29 ± 0,09	+ 0,06 ±
7	wie 3	5	5,0	− 0,49	+ 0,3
8	wie 3	4	5,0	− 0,26	+ 0,3
9	1,50 ± 0,14[4]	4	5,0	− 0,07	+ 0,4
10	wie 2	6	10,0	− 0,11 ± 0,1	+ 0,29 ±
11	wie 3	5	10,0	− 0,09	+ 0,2

[1] 31 Werte. — [2] 76 Werte. — [3] Wie 1, aber Streuung des Kollektivs. — [4] 16 Werte.

Tabelle 6b. Natriumausscheidung nach einmaliger Coffeininjektion. Ergebnis.

Versuchsgruppe	Coffein mg/100 g	Änderung in % 1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
1	1,0	—	—	—	—	− 12,7			
2	2,5	+ 36,1	+ 38,9	—	—	—	—		
3	2,5	—	—	—	—	—	—	− 12,7	
4	2,5	—	—	+ 30,1	—	—			
5	5,0	+ 38,9	+ 66,7	+ 25,0					
6	5,0	+ 19,4	+ 22,2	—	+ 16,7				
7	5,0	+ 25,4	− 44,4	+ 22,2	–				
8	5,0	—	—	+ 11,1	—	—	+ 57,1		
9	5,0	+ 58,5	− 33,9	+ 26,2	+ 21,6	+ 18,4	—	+ 60,0	—
10	10,0	—	—	+ 66,7	+ 25,0	+ 36,1	+ 16,7		
11	10,0	+ 58,7	− 77,8	+ 33,4	+ 22,2	+ 30,2	+ 22,2	+ 28,6	

h einmaliger Coffeininjektion.

über den Normalwerten

3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
) ± 0,03	+ 0,03 ± 0,03	− 0,08 ± 0,03			
),03 ± 0,07	+ 0,01 ± 0,06	+ 0,08 ± 0,09	− 0,02 ± 0,05		
− 0,02	+ 0,06	+ 0,02	− 0,04	− 0,08	
+ 0,19	+ 0,03	− 0,03			
+ 0,09					
),08 ± 0,09	+ 0,06 ± 0,03				
− 0,14	+ 0,03				
+ 0,07	− 0,02	− 0,05	+ 0,36		
+ 0,17	+ 0,14	+ 0,12	− 0,06	+ 0,39	+ 0,05
),24 ± 0,13	− 0,09 ± 0,02	+ 0,13 ± 0,06	− 0,06 ± 0,05		
+ 0,21	+ 0,14	+ 0,19	+ 0,14	+ 0,18	

h einmaliger Coffeininjektion.

über den Normalwerten

3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
0,16 ± 0,07	+ 0,24 ± 0,04	− 0,03 ± 0,16			
,28 ± 0,13	+ 0,15 ± 0,14	+ 0,21 ± 0,12	− 0,08 ± 0,08		
− 0,11	− 0,11	+ 0,13	+ 0,15	+ 0,21	
+ 0,43	+ 0,32	− 0,13			
+ 0,40					
0,13 ± 0,25	− 0,18 ± 0,04				
+ 0,24	+ 0,45				
+ 0,35	+ 0,37	+ 0,41	− 0,72		
+ 0,35	+ 0,52	+ 0,46	+ 0,01	+ 0,20	+ 0,19
,23 ± 0,07	0 ± 0,05	0 ± 0,11	− 0,04 ± 0,05		
+ 0,12	+ 0,02	− 0,01	+ 0,03	− 0,01	

Tabelle 7b. Kaliumausscheidung nach einmaliger Coffeininjektion. Ergebnis.

Versuchs-gruppe	Coffein mg/100 g	Änderung in %							
		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
1	1,0	+ 10,6	+ 18,3	+ 11,3	+ 17,0	—			
2	2,5	+ 75,4	+ 42,0	+ 40,6	+ 21,7	+ 30,4	+ 11,6		
3	2,5	—	+ 47,2	—	—	+ 9,2	+ 10,6	+ 14,8	
4	2,5	—	—	+ 30,3	+ 22,5	− 9,2			
5	5,0	+ 63,8	+ 92,8	+ 58,0					
6	5,0	− 42,0	+ 8,7	+ 18,8	− 26,1				
7	5,0	− 34,5	+ 23,9	+ 16,9	+ 31,8				
8	5,0	− 18,3	+ 26,8	+ 24,6	+ 26,8	+ 28,9	− 50,7		
9	5,0	—	+ 31,3	+ 23,3	+ 34,7	+ 30,7	—	+ 13,3	+ 12,7
10	10,0	− 15,9	+ 42,0	+ 33,3	—	—	—		
11	10,0	—	+ 14,8	+ 8,4	—	—	—		

rungen am 2. und 3. Tage sind nicht als Coffeinwirkung zu bewerten, da auch bei der Injektion entsprechender Wassermengen (gestrichelte Kurve der Abb. 4) beträchtliche K-Vermehrungen zur Beobachtung kamen. Das Ausbleiben einer Wirkung jenseits des 3. Tages und die anfängliche negative Phase wird man als Ausdruck der beginnenden toxischen Wirkung deuten können.

Auch die bei den Untersuchungen der K-Ausscheidung erhobenen Befunde zeigen eine langanhaltende Wirkung subcutaner Coffeininjektionen, im Bereich der Dosen von 1—5 mg/100 g im wesentlichen in einer vermehrten K-Ausscheidung über mehrere Tage. Die Kurve der K-Ausscheidung legt die Vermutung nahe, daß sie eng mit einer abgelaufenen Erregung zusammenhängt. Diese ist aber bei der hohen Dosierung nicht mehr vorhanden (Beobachtungen von Druckrey[19] und auch Hindemith[17]). Solche Befunde wurden von Eichler[20] bei NaCl- und NaJ-Vergiftung und sogar bei einfacher Belichtung erhoben. Diese Vermutung ist zwar möglich, jedoch nicht zwingend, da es eine Hemmung der K-Ausscheidung bei Nebenniereninsuffizienz gibt. Hier gibt es Probleme.

Zusammenfassung der Winterversuche.

Entsprechend den zahlreichen, schwer zu überblickenden Einzelbefunden (Wasserversuche, 4 Coffeindosen, 4 geprüfte Teilwirkungen) wurden die verschiedenen, jeweils zu einer Coffeindosis gehörenden Versuchsgruppen zusammengefaßt und die so gewonnenen Ergebnisse zur Abb. 5 vereinigt. Diese zeigt die prozentualen Änderungen der Harnmenge, des Harn-Cl, -Na und -K nach Injektion von Wasser oder 1—10 mg Coffein/100 g, ferner die prozentualen Änderungen der Konzentration. Die Betrachtung der Abb. 5 ergibt folgendes:

1. Wie früher beschrieben, hört die Wirkung subcutaner Injektionen von destilliertem Wasser praktisch mit dem 3. Tage auf. Man wird also bei den Coffeinversuchen einmal Art und Stärke der Veränderungen in dieser Zeit mit der Wirkung der Injektion an sich vergleichen müssen. Alle jenseits des 3. Tages auftretenden Änderungen sind ohne diese Korrektur als eindeutige Coffeinwirkungen aufzufassen:

2. Mit Ausnahme der Beeinflussung der K-Ausscheidung durch die höchste Dosis zeigen im Dosierungsbereich von 2,5—10 mg/100 g alle Teilabbildungen eine eindeutige Wirkung z. T. weit über den 3. Tag hinaus. Auch die quantitative Betrachtung der Veränderungen des 1.—3. Tages ergibt sichere Coffeinwirkungen.

3. Die Beeinflussung der verschiedenen untersuchten Teilfaktoren beginnt bei verschiedenen Dosen. So ändert die kleinste geprüfte Dosis (1 mg/100 g) Harnmenge und Harn-Na noch nicht, Harn-Cl und Harn-K

[19] Druckrey u. Schreiber: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 208 (1938). — [20] Eichler: Unveröffentlichte Versuche.

dagegen bereits deutlich. Die Verschiedenartigkeit der Beeinflussung zeigt sich auch in der Tatsache, daß zwar Harnmenge und Ausscheidung von Cl, Na und K im Prinzip gesteigert werden, daß aber diese Steigerung

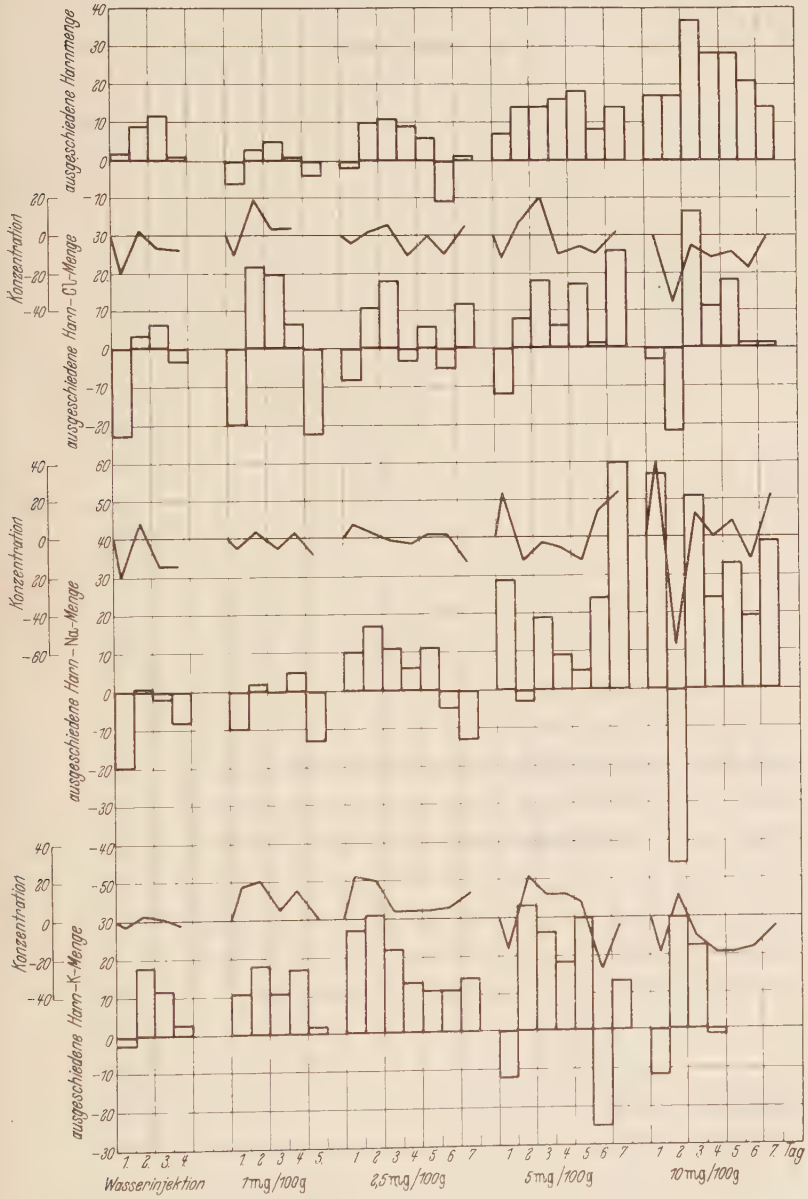


Abb. 5. Zusammenfassung der Winterversuche. Änderung der ausgeschiedenen Mengen und der Konzentrationen in %.

quantitativ verschieden ist (s. Schwankungen der Konzentration und Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationskurven). Hingewiesen sei hier ferner auf die Unterschiede zwischen der Beeinflussung der K- und der Na-Ausscheidung. Den 3 in der Abbildung deutlichen K-Verminderungen bei 5 und 10 mg entsprechen Steigerungen der Na-Ausscheidung, der Na-Verminderung am 2. Tage der 10-mg-Versuche eine K-Vermehrung.

4. Im allgemeinen nimmt die Wirkung mit steigender Dosierung hinsichtlich Dauer und Stärke zu.

B. Sommerversuche.

Die in den Sommermonaten beobachtete andersartige Wirkung kommt deutlich in der Tabelle 8 für die Dosis 2,5 mg/100 g und in der Abb. 6 für die Dosis 5 mg/100 g zum Ausdruck.

Tabelle 8. Sommerversuch mit 2,5 mg/100 g.
(Versuchsgruppe von 4 Tieren.)

	Änderung in %				
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
Harnmenge	+ 11,5	+ 11,5	+ 13,5	+ 24,3	+ 8,8
Harn-Cl	− 3,9	− 3,9	− 5,8	− 3,9	− 3,9
Harn-Na	− 41,5	− 35,8	− 70,0	− 7,6	− 15,1
Harn-K	− 14,1	+ 2,1	− 28,2	+ 40,2	+ 42,4
Cl-Konzentration	− 6,8	− 13,7	− 16,9	− 22,6	− 11,5
Na-Konzentration	− 47,5	− 42,4	− 73,4	− 25,9	− 11,7
K-Konzentration	− 23,0	− 8,4	− 37,0	+ 12,7	+ 30,8

In beiden Versuchsgruppen ist die Harnmenge wie bei den Winterversuchen über mehrere Tage vermehrt. Die Unterschiede betreffen in erster Linie das Harn-Cl und das Harn-Na. Die Cl-Ausscheidung bleibt im Versuch mit 2,5 mg normal und weist am 1. Tage nach der Injektion von 5 mg/100 g eine wahrscheinlich auf die Injektion an sich zu beziehende Verminderung auf. Die Schwankungen des 6. und 7. Tages können nicht bewertet werden. Es bleibt somit in den Sommermonaten die Cl-Vermehrung aus. Völlig eindeutig ist fernerhin das Verhalten der Na-Ausscheidung. Beide Versuchsgruppen zeigen an sämtlichen Versuchstagen nur Verminderungen, die z. T. sehr beträchtlich sind. Deutlich werden die Unterschiede zwischen Winter- und Sommerversuchen auch bei der Betrachtung der Konzentrationskurven der Abb. 5 und 6. Hinsichtlich des Kaliums liegen die Verhältnisse nicht so klar. Auffallend sind allerdings die Verminderungen am 1. und 3. Tage im 2,5 mg-Versuch, die in den Wintermonaten keine Parallele finden. Dagegen ist der Befund bei 5 mg/100 g, wie ein Vergleich mit der Versuchsgruppe 6 der Tabelle 7 zeigt, nicht als abweichend zu deuten. Im Hinblick auf weitere Unter-

suchungen ist bemerkenswert die Tatsache, daß die Harn- und K-Vermehrungen im Sommer erhalten bleiben. Harnmenge und Harn-K gingen auch in den Wasserversuchen (s. Abb. 1 und 4) parallel.

Das verschiedenartige Verhalten der K- und Na-Ausscheidung in den Sommerversuchen ergibt naturgemäß ganz erhebliche Ausschläge des Quotienten K/Na (Tabelle 9).

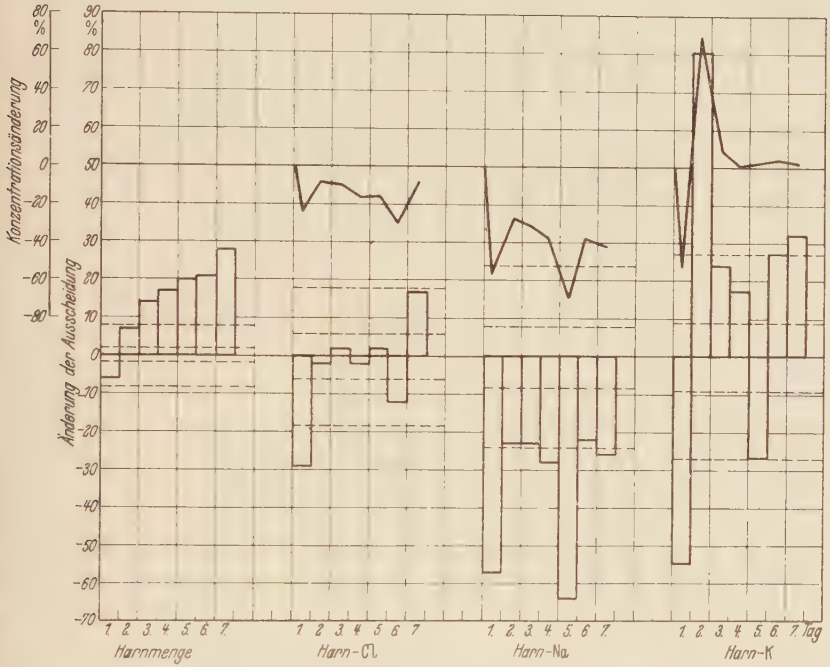


Abb. 6. Sommerversuch mit 5 mg Coffein/100 g. (Versuchsgruppe von 5 Tieren.) Gestrichelte Linien: einfache und dreifache Streuung.

Tabelle 9. Verhalten des Quotienten K/Na nach Coffeininjektion im Winter und im Sommer. (Änderungen in %.)

Pro 100 g verabfolgt	Winterversuche (Änderung in %)						Sommerversuche (Änderung in %)					
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
Wasser	+ 26	+ 17	+ 17	+ 13								
1 mg	+ 22	+ 13	+ 9	+ 9	+ 9							
2,5 „	+ 9	+ 9	+ 5	+ 5	0	+ 2	+ 47	+ 59	+171	+ 51	+ 67	
5,0 „	− 32	+ 54	+ 18	+ 19	+ 27	− 25	+ 2	+133	+ 60	+ 63	+ 99	+ 68
10,0 „	− 48	+ 14	− 24	− 19	− 29	0						

Die Deutung der beschriebenen Unterschiede als jahreszeitliche Schwankungen der Coffeinwirkung ergibt sich aus folgenden Tatsachen:

1. Die gleichsinnig verlaufenen Winterversuche wurden in zwei Wintern, die Sommerversuche im dazwischenliegenden Sommer durchgeführt.

2. Im zweiten Winter angesetzte Versuche, in denen der K-Gehalt der Nahrung variiert wurde, ergaben hinsichtlich der Cl- und Na-Ausscheidung analoge Veränderungen wie die oben beschriebenen Winterversuche.

3. Im Sommer 1939 unter variierten Bedingungen angesetzte Versuchsgruppen zeigten Veränderungen der Cl-Ausscheidung entsprechend den Sommerversuchen der Tabelle 8 und Abb. 6.

4. Weiterhin fand in unserem Institut Hindemith[17] bei Untersuchungen über den Gasstoffwechsel der weißen Ratte ebenfalls ausgesprochene jahreszeitliche Schwankungen. Dabei war der O_2-Verbrauch im Sommer vermindert, im Winter erhöht. Die mangelnde Stoffwechselwirkung des Coffeins betrifft also sowohl die Na- und Cl-Ausscheidung als auch den Sauerstoffverbrauch. Diese Tatsache könnte eine Angriffsmöglichkeit für die Untersuchung der Beziehungen zwischen Energie- und Mineralstoffwechsel bieten.

IV. Besprechung.

Da die vorstehenden Ausführungen bereits übersichtliche Zusammenstellungen der erhobenen Einzelbefunde bringen, kann sich die abschließende Besprechung auf einige wesentliche Punkte beschränken. Zwei Grundtatsachen wurden ermittelt, 1. die lange Dauer der Wirkung einmaliger Coffeingabe auf die Ausscheidung des Harns und der geprüften Mineralstoffe und 2. die völlig verschiedenartige Reaktion des Mineralstoffwechsels der Ratte auf Coffein im Winter und im Sommer.

Da wir bereits in weiteren Untersuchungen einen Einblick in den Mechanismus der langanhaltenden Coffeinwirkung zu erarbeiten versuchen, soll an dieser Stelle von einer Erörterung der theoretischen Möglichkeiten abgesehen werden. Eine Deutung der erhobenen Befunde ist ohne die Annahme einer zum mindesten wesentlichen Beteiligung extrarenaler Faktoren nicht möglich. Das zeigen einmal die jahreszeitlichen Verschiedenheiten der Wirkung, die früher beschriebenen Unterschiede der Coffeinwirkung auf männliche und weibliche Kaninchen und die Ergebnisse unserer Versuche an coffeingewöhnten Ratten[21], vor allem die verschiedenartige Beeinflussung der einzelnen Faktoren und der gar nicht selten wellenförmige Verlauf der Wirkung. Es sei in diesem Zusammenhang an das Auftreten der einzelnen Wirkungen bei verschiedenen Dosen, das Verschwinden nur der Kaliumvermehrung bei der höchsten Dosis und das häufig gegensätzliche Verhalten der Na- und K-Ausscheidung erinnert.

Bei der Deutung der Befunde wird man sich keineswegs auf die zunächst untersuchten Mineralstoffe beschränken können. Die Tabelle 10 zeigt in den Winterversuchen mit 2,5 mg eine starke Erhöhung des Quotienten K + Na/Cl, eine Erhöhung, die weit über die nach Wasserinjektion

[21] Vollmer u. Richter: Naunyn-Schmiedebergs Arch. (im Druck).

Tabelle 10. Verhalten des Quotienten K + Na/Cl nach Coffeininjektion. (Änderung in %.)

Pro 100 g verabfolgt	Winterversuche						Sommerversuche					
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
Wasser	+ 18	+ 8	+ 8	0								
1,0 mg	+ 26	− 5	− 8	+ 8	− 5							
2,5 „	+ 24	+ 21	0	+ 17	0	+ 7	− 27	− 8	41	+ 28	+ 67	
5,0 „	+ 28	+ 10	− 4	+ 20	+ 11	+ 9	− 38	+ 44	+ 5	+ 3	− 42	+ 23
10,0 „	+ 16	+ 28	+ 12	− 4	0	+ 8						

beobachtete hinausgeht. Man wird also entweder eine vermehrte Ausschüttung von Basen oder aber eine vermehrte Ausscheidung organischer Säuren, also unter Umständen eine Wirkung in Betracht ziehen müssen, die über den Mineralstoffwechsel hinausgeht.

Aber schon die ausschließliche Berücksichtigung der in den Bereich unserer Untersuchungen gezogenen Mineralstoffe ergibt die verschiedensten Möglichkeiten eines bisher unbekannten Angriffsortes des Coffeins. Wir wissen, daß im Mineralstoffwechsel Drüsen mit innerer Sekretion, wie Thyreoidea, Nebennieren und Hypophyse maßgeblich mitwirken. Jetzt darüber schon zu diskutieren, wäre zwar möglich, aber so lange müßig, als wir beabsichtigen, durch Experimente die Probleme zu fördern. — Hierher gehört auch die Frage, inwieweit manche Wirkungen durch die Anwesenheit von Coffein selbst bedingt sind, oder ob es sich um die Folgeerscheinungen (Hysteresis) einer früheren Coffeininjektion handelt. Wir haben noch am 3. Tage nach Coffeininjektion in einer Reihe von Versuchen mit 5 und 10 mg das Auftreten von Coffeinsublimaten im oberen Teil der Veraschungsröhrchen gesehen. Diese Beobachtung zeigt einen Unterschied des Coffeinstoffwechsels der Ratte gegenüber dem des Menschen und hindert die einfache Übertragung meiner Beobachtungen auf den Menschen. Diese kurzen Andeutungen sollen vor allem dartun, daß die mitgeteilten mühseligen Untersuchungen die notwendige Grundlage und den Durchgang zu einer Fülle weitreichender Probleme darstellen. Diese Probleme verbergen sich aber bei der bisher üblichen Prüfung über wenige Stunden, in denen gerade bei den Purinkörpern Gefäßwirkungen und Angriff an den spezifischen Nierenelementen jede weitere Sicht verschleiern.

Zusammenfassung.

1. In langfristigen Bilanzversuchen an einer großen Zahl weißer Ratten wurde die Wirkung einmaliger subcutaner Injektionen von Coffein auf Harnmenge und Mineralausscheidung geprüft. Dabei gesammelte methodische Erfahrungen werden mitgeteilt.

2. Einmalige Coffeingaben bewirken Änderungen der Harnmenge und der Ausscheidung von Chlor, Natrium und Kalium, die bis zu 7 Tage lang anhalten können. Diese Wirkung nimmt mit steigender Dosis

(1—10 mg/100 g) hinsichtlich Stärke und Dauer zu. Die Versuche zeigen, daß die früher beschriebene Wirkung der Injektion an sich an den ersten Versuchstagen in Rechnung gestellt werden muß.

3. Es bestehen eindeutige jahreszeitliche Unterschiede der Coffeinwirkung. Während im Winter sowohl die Harnausscheidung als auch die Ausscheidung von Cl, Na und K gesteigert werden, zeigt sich im Sommer eine beträchtliche Verminderung der Na-Ausscheidung bei praktisch normaler Cl-Bilanz und Vermehrung der Harnmenge und des Harn-K.

4. Die Beeinflussung der Cl- und K-Ausscheidung beginnt bei einer kleineren Dosis (1 mg/100 g) als die Beeinflussung der Harnmenge und des Harn-Na (2,5 mg/100 g). Auch im Bereich der höheren Dosen geht die Wirkung auf Harnmenge und Ausscheidung der einzelnen Mineralstoffe nicht immer parallel.

5. Die mitgeteilten Befunde unterstreichen die Bedeutung extrarenaler Faktoren bei der Purinkörperdiurese und stellen einen Angriffspunkt für die Untersuchung derselben dar. Prinzipiell erscheint für Untersuchungen über die Beeinflussung des Mineralhaushaltes durch einmalige Gaben wirksamer Substanzen die Prüfung der Wirkung über längere Zeit notwendig und aussichtsreich.

Aus dem Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie der Universität Breslau. (Direktor: Prof. Dr. O. Eichler.)

Versuche an coffeingewöhnten Ratten über die Wirkung des Coffeins auf Mineralausscheidung und Harnmenge.

Von

Hubert Vollmer und **Georg Richter.**

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 29. Dezember 1939.)

Es ist bekannt, daß verschiedene Wirkungen des Coffeins bei wiederholter Verabfolgung gleicher Dosen vermindert werden[1]. Auch für die diuretische Wirkung des Coffeins liegen Angaben vor, nach denen die Abnahme der Wirkung rasch eintritt[2] und die diuretisch wirkende Grenzdosis über längere Zeit erheblich ansteigt[3]. Die Deutung dieser Befunde ist außerordentlich schwierig, da an der Coffeindiurese Gefäßwirkungen, Wirkungen auf spezifische Elemente der Nieren und extrarenale Faktoren je nach der Versuchsanordnung in verschiedenem Ausmaße beteiligt sein können.

Vorangegangene Untersuchungen[4, 5] beschäftigten sich vor allem mit den extrarenalen Faktoren der Purinkörperdiurese. Sie unterscheiden sich von den Untersuchungen anderer Autoren prinzipiell durch Verfolgung der Wirkung einmaliger Coffeingaben über mehrtägige Versuchsperioden. Dabei zeigten sich Wirkungen, die oft mehr als 4 Tage anhielten. Eine vorwiegende Beteiligung renaler Faktoren an diesen langanhaltenden Veränderungen ist sehr unwahrscheinlich, vor allem, weil die Ausscheidung der geprüften Mineralstoffe und des Wassers durchaus nicht gleichsinnig verläuft. Außerdem wurden während der mehrtägigen Versuchsperioden nur 24-Stunden-Werte ermittelt, also auf die Prüfung der bekannten Wirkung während der ersten Stunden nach Coffeingabe verzichtet.

Die im Vergleich zu Kontrolltieren normalen Werte bei unseren langdauernd mit täglichen Coffeingaben behandelten Tieren zeigen, daß auch die langanhaltenden Wirkungen bei der Coffeingewöhnung verschwinden.

Bei der Erzwingung von Veränderungen bei einem im dynamischen Gleichgewicht (steady state) befindlichen Organismus kann nach dem Prinzip von Le Chatelier das Auftreten von Vorgängen (reactio) erwartet werden, die der Veränderung (actio) entgegenwirken. Da dabei die reactio

[1] Literatur s. bei Eichler: Kaffee und Coffein, Berlin 1938, S. 135ff. [2] Rees: Amer. J. Physiol. **68**, 136 (1924). — [3] Myers: J. Pharmacol. (Am.) **23**, 465 (1924); Kihara: zit. nach Ber. Physiol. **48**, 135 (1928). [4] Vollmer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 551 (1940). Einzelne Versuche ebenda **193**, 483 (1939). [5] Vollmer u. Grünig: Ebenda **193**, 539 (1939).

meist nicht zeitlich kongruent zur actio verlaufen wird, wird man sie unter geeigneten Versuchsbedingungen isoliert beobachten können. Dafür scheinen Versuche an gewöhnten Tieren besonders geeignet, bei denen sich die reactio einmal beim Absetzen der verwendeten Substanz, ferner bei erneuter Gabe (in der Phase der reactio) dartun könnte. Daß gerade beim Coffein derartiges zu erwarten war, ließ sich aus den Versuchen von Hindemith [6] erschließen, bei denen eine Stoffwechselsteigerung schon nach einigen täglichen Coffeingaben geringer wurde, schließlich verschwand und sogar einer Senkung Platz machte.

Methodik.

Einzelheiten hinsichtlich der Diät und der chemischen Methodik s. bei Vollmer[4].

Versuchsmaterial. Als Versuchstiere verwendeten wir männliche Ratten, die über lange Zeit mit Coffeininjektionen vorbehandelt waren. Insgesamt wurden in vier Serien 25 Tiere geprüft. Über die Coffeinvorbehandlung geben die folgenden Zahlen Aufschluß.

Serie Nr.	Zahl der Tiere	Coffeindosis mg/100 g	Tägliche Coffeingaben in folgender Zeit
I	6	2,5	7. IV. 1938 bis 7. VII. 1938
II	5	2,5	21. X. 1938 „ 2. XII. 1938
III	8	5,0	14. XII. 1937 „ 19. IV. 1938
IV	6	5,0	2. IX. 1938 „ 14. XI. 1938

Die Tiere wiesen keinerlei Schädigungen auf. Daß die Gewichtsentwicklung normal war, zeigen die folgenden Zahlen.

Serie Nr.	Coffeindosis mg/100 g	Gewicht zu Beginn der Vorbehandlung	Gewicht am Ende der Vorbehandlung
I	2,5	202	279
Kontrollen zu I	—	197	299
II	2,5	293	283
III	5,0	197	255
IV	5,0	291	277
Kontrollen zu IV	—	300	295

Diät. Während der letzten Tage der angegebenen Vorbehandlungsperioden erhielten die Tiere bereits in den Einzelkäfigen abgewogene Mengen unseres Futters. Vorher war ein Mischfutter mit Hafer, Kartoffeln usw. verabfolgt worden. Am Tage nach Abschluß der Vorperiode begannen die Bilanzversuche, wobei die Tiere zunächst mit Coffein weiterbehandelt wurden.

Die Diät wurde wie in den vorangegangenen Untersuchungen aus Stärke, Casein, Trockenhefe, Lebertran, Salzgemisch, Agar-Agar und Wasser bereitet. Von dem fertigen pastenartigen Gemisch erhielten die Tiere täglich 40 oder 45 g. Das Salzgemisch enthielt reichliche Mengen der einzelnen Mineralstoffe. Es wurde aus NaCl, $MgSO_4$, Na_2HPO_4, $Ca_2H_2(PO_4)_2 \cdot 4\,H_2O$, K_2HPO_4, Calcium lacticum und Ferrum citricum hergestellt.

[6] Hindemith: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 587 (1939).

Prinzip der chemischen Methodik.

Kalium und Natrium wurden teils in den Tagesharnen der Einzeltiere, teils in Tagessammelharnen der einzelnen Versuchsgruppen, Chlor stets in den Einzelharnen bestimmt. Chlor wurde nach Volhard, Kalium nach Tisdall und Kramer, Natrium gravimetrisch als Natriumuranylzinkacetat bestimmt. Für die Bestimmung von K und Na wurde mit Salpetersäure und Perhydrol in großen Reagensgläsern aus Pyrexglas auf dem Sandbade verascht.

Auswertung. Bei der Auswertung wurden in üblicher Weise die Streuungen der Werte und der Differenzen errechnet. In allen Fällen, in denen Einzelharne untersucht wurden, enthalten unsere Tabellen bei den Normalwerten die Streuung des Durchschnittswertes, bei Untersuchung von Sammelharnen dagegen die Streuung des Kollektivs. Wie in den übrigen Arbeiten sind die Werte für Cl, Na und K in Millimol angegeben.

Bilanz.

Bei der Untersuchung der Wirkung einmaliger Coffeininjektionen hatte ein großes Analysenmaterial gezeigt, daß man auf die Analyse der Faeces verzichten kann, da die mit den Faeces ausgeschiedenen Mengen von Cl, Na und K weitgehend konstant sind und durch die Injektion nicht beeinflußt werden[4].

Die Tiere unserer vier Gewöhnungsserien erhielten mit dem Futter folgende Mengen der drei Mineralstoffe (in mg)[7].

	Cl	Na	K
Serie I und III	21,1	16,5	61,6
Serie II und IV	25,2	21,3	71,1

In den Übersichtstabellen dieser Arbeit finden sich — in mg umgerechnet — folgende Durchschnittswerte für die Tagesausscheidung im Harn.

	Cl	Na	K
Serie I und III	19,5	9,4	37,5
Serie II und IV	22,4	16,3	68,4

Diese Zahlen zeigen eindeutig, daß sich bei den Tieren der Serien II und IV der Mineralstoffwechsel im Gleichgewicht befand. Rechnet man nämlich die früher in den Faeces ermittelten Mengen (0,67—2,3 mg Cl; 2,9—6,1 mg Na; 3,9—10,7 mg K; Durchschnittswerte etwa in der Mitte) zu den im Harn wiedergefundenen hinzu, so ergeben sich praktisch die zugeführten Mengen. Wir haben deshalb bei diesen beiden Serien von der Untersuchung der Faeces Abstand genommen.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Serien I und III. Hier besteht ein sehr erheblicher Unterschied zwischen Zufuhr und Ausscheidung im Harn beim Na und K, während sich der Chlorstoffwechsel im Gleichgewicht befindet. Entsprechend analogen Befunden in anderen Serien[1] konnte K- und Na-Retention angenommen werden. Die Verwendung solcher Tiere zum Versuch erklärt sich daraus, daß die beiden Serien angesetzt wurden, als uns Erfahrungen über die

[7] Den Zahlen liegen Analysen der einzelnen Futterportionen zugrunde. Da die Futterbestandteile (Stärke, Casein, Hefe, Lebertran) Mineralstoffe in wechselnder Menge enthalten, ist die Kontrolle des Futters erforderlich. Während der einzelnen Serien trat selbstverständlich kein Wechsel der Futterbestandteile ein. — Für die Analyse wurde das getrocknete Futter nach Rossenbeck verascht, danach mit den gleichen Methoden wie Harne und Faeces auf Na und K analysiert. Die Bestimmung des Cl erfolgte nach dem Prinzip des „offenen Carius".

Dauer der Einstellung ins Mineralgleichgewicht noch fehlten. Man erhält die Na- und K-Werte im allgemeinen erst nach Abschluß des eigentlichen Tierversuches, da die Aufarbeitung der Harne zur Bestimmung des K und Na langwierig ist.

Um eindeutig festzustellen, daß es sich bei den Differenzen zwischen Zufuhr und Ausscheidung im Harn in den Serien I und III tatsächlich um Retention und nicht um vermehrte Ausscheidung mit den Faeces handelt, haben wir die Faeces von 6 Tieren untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

	Cl	K	Na
Während der Coffeinbehandlung	0,26—0,91	3,9 9,4	1,3—4,5
Nach dem Absetzen.....	0,36—0,64	5,7—8,0	3,7—4,1
In weiteren Coffeinversuchen	0,20- 0,60	3,5—9,4	2,1—5,4

Auch hier ändert sich der Gehalt der Faeces an Cl, Na und K beim Coffeinversuch und beim Absetzen des Coffeins nicht. Es steht fernerhin nach diesen Zahlen eindeutig fest, daß die Tiere der Serien I und III während der Versuche noch Na und K retinierten, während sich die Cl-Ausscheidung bereits im Gleichgewicht befand. Dieser Befund unterstreicht die Notwendigkeit langer Vorperioden. Da ein prinzipieller Wirkungsunterschied nicht bestand, konnten in der folgenden Darstellung auch die Tiere der Serien I und III verwendet werden.

Versuche.

Während des Bilanzversuches erhielten unsere Tiere zunächst für einige Tage das Coffein weiter. Dann unterblieben die Injektionen für einen Zeitraum von 4 oder 5 Tagen, nach denen eine einmalige Coffeindosis verabfolgt wurde. In den meisten Versuchen wurde diesem Coffeinversuch nach mehrtägiger Pause ein zweiter angeschlossen. Von Interesse ist einmal das Verhalten der Mineralausscheidung und der Harnmenge an den Tagen nach dem Absetzen des Coffeins, dann die Reaktion auf die späteren einzelnen Coffeininjektionen.

A. Verhältnisse beim Absetzen des Coffeins.

Das Verhalten der Harnmenge und der Ausscheidung von Chlor, Natrium und Kalium sind in den Tabellen 1—4 dargestellt. In diesen sind an den Versuchstagen nicht die gefundenen Werte für Harnmenge, Harn-Cl, Harn-K und Harn-Na angegeben, sondern die Differenzen gegenüber den Normalwerten mit ihrer Streuung. Die Tabellen zeigen folgendes:

Harnmenge: Die Betrachtung der Serien I, III und IV ergibt Steigerungen der Diurese um 11—21 % am zweiten Tage nach dem Absetzen des Coffeins. Zwei dieser Serien weisen bereits am ersten Tage, eine am dritten Tage leichte Harnvermehrung auf. Im Gegensatz dazu läßt die Serie II keine Veränderungen erkennen. Auffallend ist vor allem das Fehlen eines Wirkungsunterschiedes zwischen den Serien III und IV einerseits und der Serie I andererseits, d. h. zwischen den mit 5 mg/100 g und den mit 2,5 mg/100 g vorbehandelten Tieren.

Tabelle 1.

Verhalten der Harnmenge nach dem Absetzen einer langdauernden Coffeinbehandlung.

Serie Nr.	Zahl der Tiere	Coffeindosis mg/100 g	Durchschnittswert der Coffeintage	Differenzen gegenüber Normalwerten. Tage nach Absetzen des Coffeins					Änderung in %				
				1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	6	2,5	15,2 ± 0,3 *	+ 2,0 ± 1,1	3,2 ± 1,2	+ 0,3 ± 1,1	+ 2,0 ± 1,5		+ 12,9	+ 21,1	–	+ 13,4	
II	5	2,5	24,7 ± 0,4 **	0,3 ± 1,2	1,4 ± 1,4	– 0,5 ± 1,1	– 0,4 ± 1,0			—		—	
III	8	5,0	wie 1	+ 0,54 ± 0,4	+ 2,8 ± 1,1	+ 1,7 ± 0,9	+ 0,4 ± 0,7			+ 18,3	+ 11,4	–	
IV	6	5,0	20,3 ± 0,4 ***	+ 1,5 ± 1,2	+ 2,2 ± 1,5	+ 0,5 ± 0,8	– 1,5 ± 0,6	+ 0,3 ± 0,6	+ 7,4	+ 10,8	—	– 7,4	—

* 84 Werte. — ** 35 Werte. — *** 54 Werte.

Tabelle 2.

Verhalten des Harnchlors nach dem Absetzen einer langdauernden Coffeinbehandlung (Cl in Millimol).

Serie Nr.	Zahl der Tiere	Coffeindosis mg/100 g	Durchschnittswert der Coffeintage	Differenzen gegenüber Normalwerten. Tage nach dem Absetzen des Coffeins					Änderung in %				
				1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	6	2,5	0,55 ± 0,01 *	+ 0,02 ± 0,06	+ 0,16 ± 0,07	– 0,1 ± 0,05	+ 0,02 ± 0,06		—	+ 29,1	– 18,2	–	
II	5	2,5	0,63 ± 0,01 **	– 0,03 ± 0,04	+ 0,14 ± 0,09	– 0,01 ± 0,05	– 0,02 ± 0,04		—	+ 22,4	—	—	
III	8	5,0	wie 1	– 0,01 ± 0,04	+ 0,19 ± 0,05	+ 0,04 ± 0,08	– 0,09 ± 0,04		—	+ 34,6	—	– 16,4	
IV	6	5,0	wie 2	+ 0,02 ± 0,05	+ 0,15 ± 0,06	+ 0,08 ± 0,04	+ 0,02 ± 0,02	0 ± 0,03	—	+ 24,0	+ 12,8	—	—

* 56 Werte. — ** 45,0 g Futter; 67 Werte.

Tabelle 3.

Verhalten des Harnnatriums nach dem Absetzen einer langdauernden Coffeinbehandlung (Na in Millimol).

Serie Nr.	Zahl der Tiere	Coffeindosis mg/100 g	Durchschnittswert der Coffeintage	Differenzen gegenüber Normalwerten. Tage nach Absetzen des Coffeins					Änderung in %				
				1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	6	2,5	0,41 ± 0,07 *	− 0,28	0	− 0,13	− 0,11		− 69,0	—	− 32,1	− 27,9	
II	5	2,5	0,71 ± 0,05 ***	− 0,35	− 0,04	− 0,11	− 0,10		− 49,4	—	− 15,3	− 13,7	
III	8	5,0	0,41 ± 0,03 ***	− 0,06 ± 0,07	+ 0,18 ± 0,07	+ 0,1 ± 0,09	− 0,13 ± 0,06		—	+ 44,7	+ 27,2	− 31,4	
IV	6	5,0	wie 2	− 0,24	− 0,1	+ 0,07	− 0,07	+ 0,08	− 33,4	− 14,2	—	—	+ 11,0

* Streuung des Kollektivs; 56 Werte. — ** 45 g Futter; 16 Werte. — *** Wie I, aber Streuung des Durchschnittswertes.

Tabelle 4.

Verhalten des Harnkaliums nach dem Absetzen einer langdauernden Coffeinbehandlung (K in Millimol).

Serie Nr.	Zahl der Tiere	Coffeindosis mg/100 g	Durchschnittswert der Coffeintage	Differenzen gegenüber Normalwerten. Tage nach Absetzen des Coffeins					Änderung in %				
				1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	6	2,5	0,95 ± 0,18 *	− 0,49	+ 0,13	− 0,29	− 0,09		− 50,9	—	− 30,3	—	
II	5	2,5	1,75 ± 0,07	− 0,24	+ 0,09	− 0,08	0		− 13,7	+ 5,0	—	—	
III	8	5,0	0,95 ± 0,08	+ 0,07 ± 0,14	+ 0,26 ± 0,1	+ 0,11 ± 0,14	0 ± 0,18		—	+ 26,7	—	—	
IV	6	5,0	wie 2	+ 0,17	− 0,03	+ 0,16	− 0,12	0	+ 9,5	—	+ 8,9	− 6,8	—

* Anmerkungen wie bei Tabelle 3

Harnchlor: Ein noch einheitlicheres Bild zeigt die Entwicklung der Chlorausscheidung. Bei keiner Serie tritt am ersten Tage nach dem Absetzen der Coffeingaben eine Änderung der Chlorwerte ein. Dagegen weisen alle Versuchsgruppen am zweiten Tage beträchtliche Chlorvermehrungen (22—35 %) auf. Die hinsichtlich der Harnmenge und des Harnchlors erhobenen Befunde gehen also am zweiten Tage parallel. Der dritte und vierte Tag lassen einige Schwankungen erkennen, die aber nicht charakteristisch sind. Nach der ursprünglichen Coffeinwirkung müßte man als reactio eigentlich erwarten, daß sich bei vermehrter Ausscheidung der Cl-Spiegel im Körper auf ein niedrigeres Niveau einstellt. Dann müßte aber im Moment des Absetzens kein Normalwert, erst recht keine Steigerung, sondern eine Einsparung von Cl erfolgen. Das Gegenteil ist der Fall. Eine Wirkung dieser Art finden wir aber beim Na und z. T. beim K.

Harnnatrium: Während Harnmenge und Harnchlor am ersten Tage nach dem Absetzen des Coffeins praktisch normal sind, weist das Harnnatrium an diesem Tage sehr erhebliche Veränderungen auf. Wie die Tabelle 3 zeigt, wurden bei 3 von 4 Serien Verminderungen der Na-Werte um 33–69 % beobachtet. Am zweiten Tage findet sich eine stärkere Steigerung der Na-Ausscheidung in einer Serie neben einer leichten Senkung in einer anderen, d. h. kein eindeutiges Bild. Demgegenüber besteht am dritten und vierten Tage in der Mehrzahl der Versuche eine Na-Verminderung. Gegenüber den Verhältnissen bei der Harnmenge und beim Harnchlor überwiegen somit beim Harnnatrium bei weitem die Verminderungen.

Harnkalium: Das Verhalten der K-Ausscheidung ist nicht völlig eindeutig. Die drei in der Tabelle 4 bei den Serien I und II zu erkennenden Verminderungen entsprechen den analogen Ergebnissen beim Natrium. Alle anderen Veränderungen sind uncharakteristisch.

Die Tabellen 1–4 zeigen, daß ein deutlicher Unterschied im Verhalten der mit 2,5 mg 100 g und der mit 5 mg 100 g behandelten Tiere nicht besteht. Unter diesen Umständen ist eine zusammenfassende Betrachtung der 4 Versuchsserien gerechtfertigt. Die Abb. 1 gibt einen Überblick der prozentualen Änderung der ausgeschiedenen Mengen, der Konzentration des Cl, Na und K und der Quotienten K/Na und (K + Na)/Cl.

Abgesehen von der Verminderung der Na-Ausscheidung am vierten Tage finden sich verwertbare Änderungen bei der Harnmenge und beim Harn-Cl nur am zweiten Tage, beim Harn-Na und Harn-K am ersten und zweiten Tage nach dem Absetzen des Coffeins. Diese Änderungen sind völlig einwandfrei, da sie Durchschnittswerte eines Materials von 25 Tieren darstellen und in vier zu verschiedenen Zeiten angesetzten Tierserien gewonnen wurden. Diese Verhältnisse müssen in späteren Untersuchungen noch einer Analyse unterzogen werden. An dieser Stelle

sei lediglich festgestellt, daß bei coffeingewöhnten Ratten das Absetzen des Coffeins charakteristische Änderungen bewirkt.

Die Verschiedenartigkeit des Verhaltens der drei geprüften Mineralstoffe und der Harnmenge kommt auf der Abb. 1 auch sehr deutlich in der Verschiedenartigkeit der Konzentrationskurven und in den Kurven für die beiden Quotienten zum Ausdruck.

Man kann also die Gewöhnung des Mineral- und Wasserhaushaltes an Coffein nicht etwa als eine einfache Empfindlichkeitsverminderung der Niere auffassen. Bei den langanhaltenden Coffeinwirkungen, wie wir

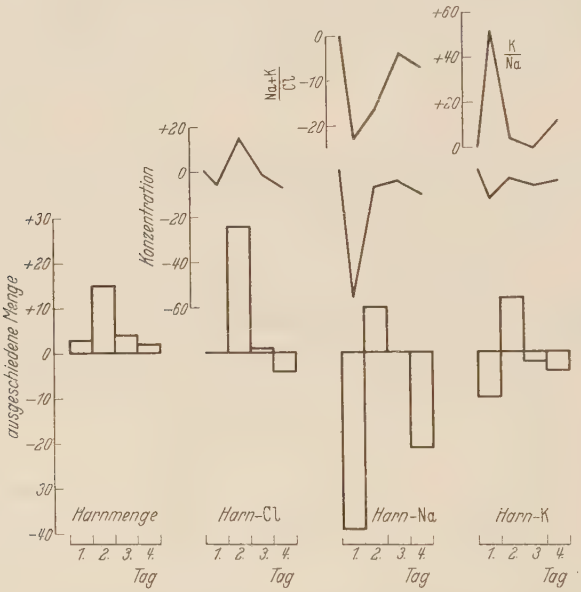


Abb. 1. Verhalten der Harnmenge und der Ausscheidung von Cl, Na und K, der Konzentrationen von Cl, Na und K und der Quotienten K/Na und (K + Na)/Cl nach Absetzen der Coffeinvorbehandlung; Änderungen in %.

sie untersuchen, dürfte der Niere überhaupt eine untergeordnete Rolle zukommen. Bei der Deutung des Verschwindens dieser Wirkungen bei der Coffeingewöhnung als Folge einer reactio werden auch Schwankungen beim Absetzen des Coffeins verständlich. Es wäre verfrüht, eine Deutung der Verschiedenartigkeit des Verhaltens der Harnmenge und des Chlors einerseits, des Natriums und des Kaliums andererseits zu versuchen (Hypophyse, Thyreoidea, Nebenniere). Auf jeden Fall aber ist mit diesen Feststellungen eine weitere Stütze für die Annahme extrarenaler Faktoren, vor allem aber ein neuer Gesichtspunkt und eine interessante Angriffsmöglichkeit für die experimentelle Weiterarbeit gewonnen.

B. Die Wirkung erneuter Coffeininjektionen.

Die Tiere der Serien I—III erhielten am fünften Tage, die der Serie IV am sechsten Tage nach dem Absetzen des Coffeins eine neue Coffeininjektion. Die Wirkung dieser Injektion wurde in den Serien I, III und IV über 5 Tage, in der Serie II über 4 Tage verfolgt. Danach wurde bei I, II und IV ein weiterer Coffeinversuch angeschlossen.

Die Tabellen 5—8 informieren über den ersten dieser Coffeinversuche. Die Verhältnisse beim zweiten Versuch werden bei der Besprechung dieser Tabellen erörtert. Außerdem muß die Wirkung dieser Coffeinversuche an gewöhnten Tieren mit der Wirkung auf ungewöhnte Tiere verglichen werden. Entsprechend den jahreszeitlich bedingten Unterschieden der Wirkung[4] dürfen dabei selbstverständlich nur Versuche der gleichen Jahreszeit verwendet werden. Wir sind in der Lage, mit Versuchsgruppen zu vergleichen, in denen die Wirkung einmaliger Coffeininjektion in den gleichen Monaten der gleichen Jahre geprüft wurden, in denen die Gewöhnungsversuche liefen.

Beeinflussung der Harnmenge.

Wie die Tabelle 5 zeigt, ist die Harnmenge am ersten Tage nach der Injektion bei 3 von 4 Tierserien vermindert. Am zweiten Tage finden sich Verminderungen in 2 Serien neben Vermehrung und normalen Werten

Tabelle 5. Verhalten der Harnmenge nach einmaliger Coffeininjektion im Anschluß an die coffeinfreien Tage.

Normalwerte und Zahl der Tiere s. Tabelle 1.

Serie Nr.	Coffein mg/100 g	Differenzen gegenüber Normalwerten 1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	Änderungen in % 1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	2,5	− 1,7 ± 1,4	− 0,04 ± 1,2	+ 2,7 ± 0,9	+ 0,12 ± 0,9	+ 1,1 ± 0,8	− 11,2	—	+ 17,8	—	+ 7,4
II	2,5	− 3,5 ± 0,7	− 2,7 ± 0,6	− 0,7 ± 0,9	− 3,4 ± 1,0		− 14.2	− 11,0	—	− 13,8	
III	5,0	+ 0.17 ± 1,2	− 1,0 ± 0,9	+ 0,7 ± 1,1	+ 0,4 ± 0,6	+ 1,3 ± 0,8	—	− 6,7	—	—	+ 8,5
IV	5,0	− 2,2 ± 2,0	+ 2,4 ± 0,8	+ 3,6 ± 0,7	+ 2,1 ± 1,1	+ 3,3 ± 1,2	− 10,8	+ 11,8	+ 17,7	+ 10,3	+ 16,2

in je einer Serie. Die Harnmenge ist am dritten Tage in zwei Fällen praktisch normal und in zwei Fällen vermehrt, während die Verhältnisse am vierten Tage wieder uncharakteristisch sind. Bei den 3 Serien, in denen die Wirkung dieser Injektion über 5 Tage verfolgt wurde, finden sich am fünften Tage Harnvermehrungen.

Auffallend ist also eine Harnverminderung am ersten, z. T. am zweiten und eine Harnvermehrung am dritten und fünften Tage nach der Injektion [8].

Der zweite Coffeinversuch, der in 3 Serien angeschlossen wurde, ergab folgende Veränderungen:

Serie	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	—	+ 20,0	+ 24,4		
II	− 16,2	—	− 7,9	− 11,0	− 7,9
IV	—	+ 18,2	+ 13,3	—	+ 11,3

Von den 3 Serien, die im ersten Versuch mit einer anfänglichen Harnverminderung reagiert hatten, lassen 2 diese Wirkung am ersten Tage vermissen. Am zweiten und dritten Tage überwiegen völlig eindeutig die Harnvermehrungen, während die Verhältnisse am vierten und fünften Tage uncharakteristisch sind.

Die zur gleichen Zeit durchgeführten Versuche an ungewöhnten Tieren [9] dagegen wiesen — wie die nachfolgenden Zahlen zeigen — am ersten Tage uncharakteristische Verhältnisse, dagegen vom zweiten bis zum fünften Tage eindeutige Harnvermehrungen auf.

Serie	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
I	+ 11,5	+ 11,5	+ 13,5	+ 24,3	—	
III	− 6,1	+ 14,2	+ 16,9	+ 20,3	+ 21,0	+ 27,7
IV	—	+ 16,2	+ 16,2	+ 15,7	+ 27,0	—

Der Vergleich dieser verschiedenen Versuche ergibt, daß die coffeingewöhnten Tiere im ersten Versuch 4—5 Tage nach dem Absetzen des Coffeins mit einer Harnverminderung über 24—48 Stunden reagieren, daß danach für einige Tage weiter Schwankungen der Harnmenge bestehen. Eine längere Dauer der Wirkung ist also bereits in diesem Versuch zu erkennen. Der angeschlossene zweite Versuch läßt mit einer Ausnahme die anfängliche Verminderung der Harnmenge vermissen. Er zeigt am zweiten und dritten Tage überwiegend Steigerungen der Harnmenge. Am ersten und zweiten Versuchstage werden also nach dieser zweiten Coffeininjektion 8—10 Tage nach dem Absetzen des Coffeins Wirkungen beobachtet, die den Wirkungen auf ungewöhnte Tiere weitgehend entsprechen. Die Reaktion dieser Tiere ist, wie das Ausbleiben von Harnsteigerungen am vierten und fünften Tage zeigt, noch nicht völlig normal. Dabei ist allerdings bei Serie IV zu berücksichtigen, daß vom ersten Versuch

[8] Dabei sei bemerkt, daß nur etwa die Hälfte der Werte, aus denen prozentuale Änderungen ermittelt wurden, statistisch echt ist. Trotzdem sind die übrigen, vorwiegend den ersten und fünften Tag betreffenden Werte brauchbar, da sie gleichsinnig sind. Es wäre im übrigen möglich, der Auswertung die prozentualen Änderungen bei den Einzeltieren zugrunde zu legen und durch Zusammenfassung der zusammengehörigen Serien sehr viel geringere Streuungen zu erhalten. Wir haben davon abgesehen, da wir auch sonst nicht in dieser Weise vorgegangen sind.

[9] Versuche von Vollmer [4].

her noch ein Wasserdefizit von rund 35 % einer Tageszufuhr bestand. Dieses Defizit aber ist, wie die langanhaltende starke Harnvermehrung in manchen Versuchsserien an ungewöhnten Tieren (s. oben Serie III der zum Vergleich herangezogenen Normalversuche) zeigt, nicht ausreichend zur Erklärung des Ausbleibens einer längerdauernden Wirkung im zweiten Coffeinversuch.

Wesentlich ist die Tatsache, daß unsere coffeingewöhnten Tiere auf eine erste neue Coffeininjektion während der ersten 48 Stunden nach dieser Injektion zumeist mit einer Harnverminderung reagieren. Sie verhalten sich also anders als ungewöhnte Tiere, bei denen eine Harnverminderung am ersten Tage selten, am zweiten Tage nie beobachtet wurde. Der Befund einer umgekehrten Wirkung bei den coffeingewöhnten Tieren würde sich sehr gut durch das Persistieren von Gegenregulationen erklären lassen.

Früher [10] wurde über die Wirkung einmaliger subcutaner Injektionen von destilliertem Wasser auf Harnmenge und Mineralausscheidung berichtet. Die dort niedergelegten Erfahrungen standen bei der Durchführung unserer Versuche erst teilweise zur Verfügung. Außerdem mußte das vorhandene Material an coffeingewöhnten Tieren vollständig zur Sicherstellung unserer Befunde verwertet werden. Die Prüfung der Injektionswirkung an sich ist für spätere Versuche in Aussicht genommen. Ein Vergleich mit den an ungewöhnten Tieren erhobenen Befunden zeigt aber völlig eindeutig, daß die negative Phase zu Beginn der Coffeinwirkung in unserem ersten Versuch nach dem Absetzen des Coffeins nichts mit der Wirkung der Injektion an sich zu tun hat.

Beeinflussung des Harnchlors.

Über das Verhalten des Harnchlors im ersten Coffeinversuch nach dem Absetzen der langdauernden Coffeinvorbehandlung gibt die Tabelle 6

Tabelle 6. Verhalten des Harnchlors nach einmaliger Coffeingabe im Anschluß an die coffeinfreien Tage.
Normalwerte und Zahl der Tiere s. Tabelle 2.

Serie Nr.	Coffein mg/100 g	Differenzen gegenüber Normalwerten					Änderungen in %				
		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	2,5	− 0,15 ± 0,06	− 0,12 ± 0,04	+ 0,12 ± 0,05	− 0,05 ± 0,03	− 0,07 ± 0,05	− 27,3	− 21,8	+ 21,8	− 9,1	− 12,7
II	2,5	− 0,11 ± 0,03	− 0,04 ± 0,02	+ 0,09 ± 0,04	0 ± 0,02		− 17,6	− 6,4	+ 14,4		
III	5,0	+ 0,08 ± 0,05	− 0,22 ± 0,04	+ 0,03 ± 0,05	0 ± 0,03	+ 0,03 ± 0,02	+ 14,6	− 40,0	—	—	+ 5,5
IV	5,0	− 0,13 ± 0,06	+ 0,02 ± 0,05	+ 0,09 ± 0,05	+ 0,02 ± 0,04	+ 0,05 ± 0,03	− 20,8	—	+ 14,4	—	+ 8,0

[10] Vollmer u. Irmer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 474 (1939).

Auskunft. An den ersten 2 Tagen stehen 6 Chlorverminderungen einem Normalwert und einer Chlorvermehrung gegenüber. Die Chlorausscheidung ist also stark vermindert. Der dritte Versuchstag dagegen zeigt in 3 der 4 Serien eine Steigerung der Chlorausscheidung, der vierte und fünfte Tag uncharakteristische Verhältnisse.

In dem an diesen Versuch angeschlossenen zweiten Coffeinversuch wurden folgende Abweichungen von den Normalwerten beobachtet:

Serie	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	— 5,5	— 16,4	+ 9,1		
II	— 14,4	—	—	— 8,0	—
IV	— 14,4	+ 11,2	+ 19,2	—	— 9,6

Auch hier ist die Cl-Verminderung in den ersten 24 Stunden deutlich, dagegen der am zweiten Tage erhobene Befund nicht eindeutig. Der dritte Tag weist zwei Cl-Vermehrungen auf. Die negativen Änderungen am ersten und die positiven Änderungen am dritten Tage nach der Coffeininjektion sind im allgemeinen geringer als die Veränderungen im ersten Versuch.

Die Wirkung des Coffeins auf die nicht gewöhnten Tiere wird durch die folgende Übersicht veranschaulicht:

Parallelversuch zu Serie	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
I	—	—	—	—	—	
III	— 28,8	—	—	—	—	— 11,5
IV	— 42,6	+ 9,8	+ 23,0	+ 11,5	+ 9,8	— 13,1

Die Versuche der Serien I und III und der zugehörigen Parallelserien wurden im Sommer 1938 durchgeführt, die der Serie IV und ihrer Parallelserie im Winter 1938/39.

Auch beim Harn-Cl ergibt der Vergleich der verschiedenen Versuche deutliche Unterschiede. Die coffeingewöhnten Tiere reagieren auf eine erneute Coffeininjektion im allgemeinen mit einer Verminderung der Cl-Ausscheidung über 48 Stunden. Es folgt eine vermehrte Ausscheidung am dritten Tag. Die Tiere zeigen im zweiten Versuch die Cl-Verminderung am ersten Tag nur noch in einer Serie, dagegen am zweiten und dritten Tag überwiegend Cl-Vermehrungen. Ein offensichtlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Versuche und den an ungewöhnten Tieren erhobenen Befunden zeigt sich vor allem in der Verminderung der Cl-Ausscheidung bei den gewöhnten Tieren im ersten Versuch nach dem Absetzen des Coffeins.

Zunächst wird somit in erster Linie Wert auf die Feststellung gelegt, daß die gewöhnten Tiere bei einem neuen, 4—5 Tage nach dem Absetzen durchgeführten Coffeinversuch mit einer Cl-Verminderung, die an un-

gewöhnten Tieren bei Injektion von destilliertem Wasser oder Coffein beobachtet wird. Die Verhältnisse liegen also ganz ähnlich wie bei der Beeinflussung der Harnmenge.

Im Bereiche der verwendeten Coffeindosen sind die Cl-Verminderungen, die bei ungewöhnten Tieren am ersten Tage nach der Injektion beobachtet werden, als Folgen der Injektion an sich aufzufassen. In den Versuchen an gewöhnten, d. h. langdauernd mit Coffeininjektionen behandelten Tieren, besteht durchaus die Möglichkeit, daß solche Tiere auf Wasserinjektion nicht oder weniger reagieren. Dann würde auch die Cl-Verminderung am ersten Tage des ersten Versuches nach dem Absetzen anders zu deuten sein, d. h. eine negative Wirkung gegenüber den Verhältnissen bei ungewöhnten Tieren darstellen.

Beeinflussung des Harnnatriums.

Hinsichtlich der Beeinflussung der Natriumausscheidung liegen die Verhältnisse weniger klar. Die Tabelle 7 zeigt in den Serien I und II

Tabelle 7. Verhalten des Harnnatriums nach einmaliger Coffeingabe im Anschluß an die coffeinfreien Tage.
Normalwerte und Zahl der Tiere s. Tabelle 3.

Serie	Coffein	Differenzen gegenüber Normalwerten					Änderungen in %				
Nr.	mg/100 g	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	2,5	− 0,11	− 0,08	− 0,01	− 0,15	− 0,21	− 26,2	− 19,8	—	− 36,5	− 52,8
II	2,5	− 0,12	− 0,16	− 0,18	− 0,06		− 16,3	− 23,0	− 25,0	− 13,3	
III	5,0	+ 0,20 ± 0,05	− 0,22 ± 0,06	− 0,12 ± 0,08	− 0,02 ± 0,07	+ 0,17 ± 0,05	+ 46,7	− 54,6	− 28,4	—	+ 41,7
IV	5,0	+ 0,08	− 0,21	+ 0,21	+ 0,01	+ 0,09	+ 11,0	− 29,0	+ 28,8	—	+ 12,0

praktisch nur Verminderungen der Ausscheidung. Die Serien III und IV dagegen weisen am ersten und fünften Tage, die Serie IV auch am dritten Tage eine gesteigerte Ausscheidung auf. Es soll nicht entschieden werden, ob dieser Unterschied auf der verschiedenen Coffeindosierung beruht (2,5 mg/100 g bei I und II; 5 mg/100 g bei III und IV).

Die Ergebnisse des angeschlossenen Coffeinversuches veranschaulichen die folgenden Zahlen:

Serie	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	—	—	+ 38,0		
II	—	+ 14,5	—	− 14,3	− 26,4
IV	+ 42,6	− 15,0	+ 12,3	− 17,8	− 15,9

In diesem zweiten Coffeinversuch fehlen die Verminderungen bei I und II. Die Änderungen in der Serie IV sind ähnlich wie im ersten Coffeinversuch, aber offenbar durch eine entgegengesetzte Wirkung variiert.

Als Vergleich bringen wir wieder die prozentualen Änderungen aus den Parallelversuchen an ungewöhnten Tieren:

Vergleichsversuch zu Serie	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	− 41,5	− 35,8	− 70,0	—	− 15,1
III	− 56,6	− 22,6	− 22,6	− 28,3	− 64,1
IV	+ 58,5	− 33,9	+ 26,2	+ 21,6	+ 18,4

Die Vergleichsserien zu den Gewöhnungsserien I und III weisen praktisch nur Senkungen auf (Sommerversuche). Die Senkungen sind bei der Vergleichsserie I sehr viel stärker als die Senkungen bei den coffeingewöhnten Tieren im ersten Versuch nach dem Absetzen der Coffeinbehandlung. Noch deutlicher ist dieses Verhalten beim Vergleichsversuch der Serie III, der überhaupt nur beträchtliche Senkungen ergab, während die gewöhnten Tiere Senkungen und Steigerungen, am Ende des fünften Versuchstages sogar eine praktisch ausgeglichene Na-Bilanz aufwiesen. Die Parallelversuche der Serie IV dagegen zeigen Steigerungen am ersten, dritten, vierten und fünften Tage neben einer Senkung am zweiten Tage nach der Injektion. In der entsprechenden Gewöhnungsserie fehlt die starke Na-Vermehrung am ersten und vierten Tage. Bei dieser Tiergruppe dürfte lediglich der Schluß gerechtfertigt sein, daß die Schwankungen der Na-Ausscheidung bei den gewöhnten Tieren geringer sind als bei den ungewöhnten.

Die hinsichtlich der Na-Ausscheidung erhobenen Befunde sind nicht so eindeutig wie die Verhältnisse bei der Harnmenge und beim Harnchlor. Sie zeigen aber deutliche Unterschiede der Wirkung bei gewöhnten und ungewöhnten Tieren und sprechen in keiner Hinsicht gegen, sondern mehr für unsere Vorstellungen.

Beeinflussung des Harnkaliums.

Wie die Tabelle 8 zeigt, ist das Verhalten der K-Ausscheidung bei den gewöhnten Tieren im ersten Coffeinversuch nach dem Absetzen der Coffeinvorbehandlung wenig charakteristisch. Es weisen die Tiere der

Tabelle 8. Verhalten des Harnkaliums nach einmaliger Coffeingabe im Anschluß an die coffeinfreien Tage.
Normalwerte und Zahl der Tiere s. Tabelle 4.

Serie	Coffein	Differenzen gegenüber Normalwerten					Änderungen in %				
Nr.	mg/100 g	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	2,5	− 0,09	+ 0,21	+ 0,14	+ 0,01	− 0,24	—	+ 22,2	—	—	− 25,6
II	2,5	− 0,3	+ 0,06	− 0,07	+ 0,05		− 17,0	—	—	—	
III	5,0	− 0,02 ± 0,15	− 0,15 ± 0,15	− 0,31 ± 0,17	− 0,36 ± 0,12	+ 0,02 ± 0,14	—	—	− 32,1	− 37,3	—
IV	5,0	− 0,33	+ 1,2	+ 0,2	− 0,07	+ 0,1	− 19,1	+ 70,2	+ 11,3	—	+ 5,6

Serie I eine Steigerung am zweiten und eine Senkung am fünften Tage, die Tiere der Serien II und III einige Senkungen neben normalen Werten auf. Lediglich in der Serie IV findet sich eine sehr starke Vermehrung der K-Ausscheidung am zweiten Tage neben einer geringen Steigerung am dritten Tage und einer Senkung am ersten Tage.

Die in den nachstehenden Zahlen veranschaulichten Befunde im anschließenden zweiten Coffeinversuch sind ebensowenig charakteristisch mit Ausnahme der beiden starken K-Vermehrungen am zweiten und dritten Tage in der Serie I.

Serie	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
I	—	+ 57,8	+ 49,3		
II	— 16,3	+ 11,3	—	—	—
IV	— 18,4	+ 9,0	— 11,9	— 6,6	—

Dagegen ergibt der Vergleich mit den Ergebnissen der gleichzeitig vorgenommenen Versuche an ungewöhnten Tieren interessante Verhältnisse (s. folgende Zahlen):

Vergleichsversuch zu Serie	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
I	—	—	+ 28,2	+ 40,2	+ 42,4	
III	— 55,4	+ 80,4	+ 23,9	—	— 28,3	+ 27,2
IV	—	+ 31,3	+ 23,3	+ 34,7	+ 30,7	—

Die ungewöhnten Tiere der Vergleichsserie zu I zeigen am dritten, vierten und fünften Tage, die der Vergleichsserie zu II am zweiten, dritten und sechsten Tage und die Vergleichsserie zu IV am ersten, zweiten, dritten und vierten Tage beträchtliche Vermehrung der K-Ausscheidung. Es ist wie bei der Harnmenge und beim Harn-Cl völlig eindeutig, daß die coffeingewöhnten Tiere auf eine neue einzelne Coffeininjektion die über mehrere Tage deutliche Vermehrung der K-Ausscheidung der ungewöhnten Tiere vermissen lassen. Zum Teil sind an die Stelle der K-Vermehrungen, wie wir sie bei den ungewöhnten Tieren sehen, K-Verminderungen getreten.

Wir finden somit beim Harnkalium, beim Harnchlor und bei der Harnmenge analoge Verhältnisse, die sich am besten durch die Möglichkeit von persistierenden Gegenregulationen bei den gewöhnten Tieren erklären lassen. Auch die hinsichtlich des Harn-Na erhobenen Befunde sprechen keineswegs gegen diese Vorstellung.

Zusammenfassung.

Es wird über Versuche an coffeingewöhnten Ratten berichtet, an denen im langfristigen Bilanzversuch das Verhalten der Harnmenge, des Harnchlors, des Harnnatriums und des Harnkaliums beim Absetzen der Coffeinbehandlung und die Wirkung späterer Coffeininjektionen geprüft wurde. Dabei ergab sich folgendes:

1. Am ersten Tage nach dem Absetzen des Coffeins tritt eine Verminderung des Harn-Na und Harn-K auf. Am zweiten Tage sind Harnmenge und Ausscheidung von Cl, Na und K gesteigert. Diese Änderungen sind nur durch die Annahme extrarenaler Faktoren beim Zustandekommen der Coffeingewöhnung des Wasser- und Mineralstoffwechsels zu erklären.

2. Eine 4—5 Tage nach dem Absetzen der langdauernden Coffeinbehandlung verabfolgte Coffeininjektion ergab Wirkungen, die der Coffeinwirkung auf ungewöhnte Tiere zumeist entgegengesetzt waren. Harnmenge und Harn-Cl waren über 24—48 Stunden vermindert. Die für ungewöhnte Tiere charakteristische K-Vermehrung über mehrere Tage blieb ebenso aus wie die langanhaltende Wirkung auf die Harnmenge. Hinsichtlich des Harn-Na sind die Unterschiede zwischen gewöhnten und ungewöhnten Tieren weniger charakteristisch. Die Befunde sprechen für das Persistieren von Gegenregulationen (reactio) als Ursache des abweichenden Verhaltens der gewöhnten Tiere.

3. Auch 8—10 Tage nach dem Absetzen der Coffeinvorbehandlung ist die Coffeinwirkung noch nicht völlig normal.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

Der Einfluß schwacher Gleichströme auf die Azetylcholinwirkung am isolierten Froschherz.

Von

Wilhelm Schroeder.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Februar 1940.)

Der veränderte Zustand, in den ein Nerv oder ein Muskel bei einer elektrischen Durchströmung gerät, wird mit Elektrotonus bezeichnet. Die Ursache dieser Zustandsänderung soll nach Nernst[1] in einer Polarisation an den Zellgrenzflächen begründet sein. Durch diese Polarisation oder Ionenkonzentrationsverschiebung kommt es zu einer Veränderung der in der Membran und als Membran fixierten Kolloide (Bethe-Toropoff[2] und Wilke und Meyerhoff[3]). Dieser Vorgang hat also den Zustand und damit die physiologischen Eigenschaften der Zellmembran, wie z. B. ihre Permeabilität, geändert.

Die Erregung einer Zelle soll nun nach der heutigen Auffassung[4] mit einer Permeabilitätssteigerung der Zellmembran einhergehen. Als Ursache dieser Permeabilitätssteigerung werden wieder Ionenkonzentrationsänderungen angesehen, die primär durch die Erregung ausgelöst werden. Wenn man künstlich den Zustand der Membran ändert, muß auch die Erregbarkeit der Zelle ab- oder zunehmen, da die Permeabilitätssteigerung sich bei einer verdichteten Membran nur schwer, bei einer aufgelockerten aber leicht erreichen läßt. Anders ausgedrückt, ist für denselben Erfolg bei einer Permeabilitätsherabsetzung ein größerer und bei einer Erhöhung ein kleinerer Reiz nötig, d. h. die Erregbarkeit der Zelle hat sich verändert (Ebbecke[5]). Der Nachweis dieser Erregbarkeitsänderung wurde schon von Pflüger[6] gebracht, der fand, daß die Erregbarkeit für elektrische Reize eines von einem galvanischen Strom durchflossenen Nerven an der Anode vermindert und an der Kathode erhöht war. Von Rosenberg[7] konnte gezeigt werden, daß ein nicht spontan schlagendes Froschherz durch schwächere Induktionsschläge erregt werden konnte, wenn sich die Elektroden in der anodisch polarisierten Zone befanden, und daß man stärkere Induktionsströme nötig hatte, wenn sie sich in der kathodisch polarisierten Zone befanden.

[1] In Höbers Physikal. Chemie d. Zelle u. Gewebe, Leipzig 1926, S. 759ff. — [2] Ebenda, S. 777. — [3] Ebenda, S. 781. — [4] Ebenda, S. 556ff., 780ff., 783ff. — [5] Erg. Physiol. usw. **35**, 796 (1933). — [6] Untersuchungen über d. Physiologie d. Elektrotonus. Berlin 1859. — [7] Z. Biol. **72**, 51, 201 (1920).

Nun unterliegt bekanntlich die — nach Engelmann so benannte — bathmotrope Eigenschaft des Herzens einer weitgehenden Beeinflussung durch die vegetativen Nervenreize des Vagus und Sympathicus, und zwar beeinflußt der Sympathicus diese Eigenschaft in positiver, der Vagus dagegen in negativer Richtung. Diese Erregbarkeitsänderung wird nun nicht nur durch eine Reizung von Sympathicus oder Vagus erreicht, sondern auch in derselben Weise, wie Löwi[8], Cannon[9], Dale und Mitarbeiter[10] gezeigt haben, durch die Zugabe der sogenannten Überträgerstoffe der Herznerven, das Adrenalin und das Azetylcholin, hervorgerufen. Auf Grund dieser bekannten Nervenwirkungen muß es möglich sein, die Erregbarkeitsverhältnisse am isoliert schlagenden Froschherzen nachzuprüfen, da ja, wenn die Vorstellungen von den Erregbarkeitsänderungen durch den polarisierenden Strom und durch die Überträgerstoffe der Herznerven richtig sind, zwischen der Wirkung des anodisch polarisierenden Stromes und der des Azetylcholins ein Synergismus und zwischen der Wirkung des kathodisch polarisierenden Stromes und der des Azetylcholins ein Antagonismus bestehen muß. Das Adrenalin muß dementsprechend synergistisch mit dem Kathodenstrom und antagonistisch zum Anodenstrom wirken. Noch aus einem weiteren Grunde wurde die Wirkung eines polarisierenden Stromes auf die Azetylcholinwirkung untersucht. Der Wirkungscharakter des Azetylcholins entspricht dem eines Potentialstoffs im Sinne der Straubschen Theorie der Potentialwirkungen (Straub[11]). Wie Gremels[12] gezeigt hat, sind es Änderungen der Potentialbedingungen, die für Wirkungsänderungen des natürlich gebildeten Vagusüberträgerstoffs sowie auch von außen zugeführten Azetylcholins verantwortlich gemacht werden müssen. So kann z. B. die Erregbarkeit des Vagus für elektrische Zusatzreize als eine Funktion der Ausgangsinnervationslage erkannt werden. Ebenso können Änderungen der Azetylcholinveresterung oder der Grenzflächendurchlässigkeit z. B. durch Physostigmin, Digitalisglykoside, Atropin u. a. eine Verlängerung, Steigerung, Abschwächung bzw. Aufhebung der Vagus-Azetylcholinwirkung zur Folge haben. Da diese Substanzen durch längere Fixation und Änderungen der Wirkungsbedingungen für Potentialstoffe gekennzeichnet sind, hat Gremels für sie die Bezeichnung „Zustandsstoffe" vorgeschlagen. Nun erhebt sich die Frage, ob nicht durch Änderungen der Zellgrenzflächendurchlässigkeit mittels eines polarisierenden Stromes die Wirkungsdauer und Wirkungsintensität des Azetylcholins unmittelbar beeinflußt wird. Durch eine Abdichtung der Zellgrenzflächen würde sich der Ausgleich eines bestimmtwertigen Konzentrationspotentials in der Richtung zum Zellinnern nicht nur verzögern, sondern es würde auch, bei Zufuhr gleich großer Azetylcholinmengen zu einer Stauung dieses Stoffes vor

[8] Pflügers Arch. **189**, 239 (1921); **193**, 201 (1922). — [9] Amer. J. Physiol. **58**, 353 (1921). — [10] Brit. med. J. **1934**. — [11] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **57**, 423 (1907). — [12] Ebenda **179**, 360 (1935).

der verdichteten Membran, d. h. zu einem erhöhten Konzentrationspotential kommen. Da dieses allein ausschlaggebend für die Wirkungsstärke ist, müßte es also auch zu einer verstärkten Azetylcholinwirkung kommen. Eine Auflockerung der Grenzflächen muß dagegen zu einer Abschwächung der Azetylcholinwirkung führen.

Methodik.

Die Versuche wurden am nach Straub isolierten Herz gemacht, das an einer umgebogenen Kanüle (mit der Herzspitze nach oben) in Ringerlösung eingetaucht war. Eine Platinelektrode befand sich in der Kanülenflüssigkeit (1 ccm), die andere in der das Herz umgebenden Flüssigkeit (45 ccm). Die Kontraktionen der Kammer wurden mit einem Schreibhebel aufgezeichnet.

Versuche.

Die Abb. 1 zeigt den Einfluß des Gleichstromes auf die Azetylcholin-Wirkung am isolierten Froschherz. Die angewandte Stromstärke beträgt

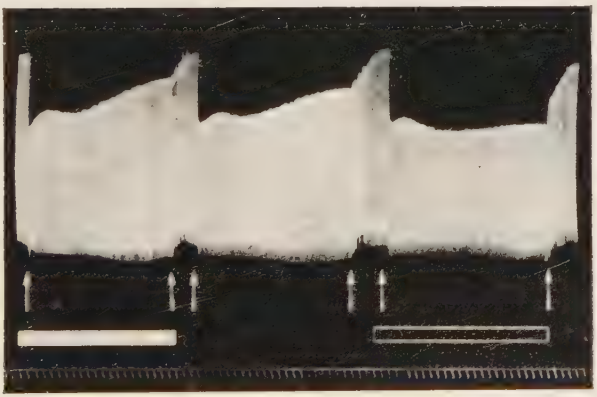


Abb. 1. ACh = Azetylcholin 0,05 γ; NR = Normalringer. ▬ Wirkungsdauer eines Kathoden- bzw. ▭ Anodenstromes von 0,025 mA. Zeitmarke: 1 Minute.

0,025 mA. Im ersten Drittel der Abbildung liegt die Kathode in der Straubschen Kanüle, die mit 1 ccm Normalringer gefüllt ist. 1 Minute nach Einschalten des Stromes werden zu dem Kanüleninhalt 0,05 γ Azetylcholin gegeben. Die Hubhöhe sinkt von 2,65 cm auf 1,7 cm und hat nach einer Zeit von 20 Minuten eine Höhe von 2,5 cm wieder erreicht. Jetzt wird der Gleichstrom unterbrochen, mit Normalringer ausgewaschen und nach 4 Minuten — ohne Strom — wieder 0,05 γ Azetylcholin zugegeben. Man erhält die gleiche Abnahme der Hubhöhe, aber nach 20 Minuten hat diese nur erst einen Wert von 2,35 cm erreicht. Nach aber-

maligem Auswaschen mit Normalringer wird nach 4 Minuten der Gleichstrom wieder eingeschaltet, diesmal mit der Anode in der Kanülenflüssigkeit. Nach Zugabe von Azetylcholin erfolgt die gleiche Abnahme der Hubhöhe, jedoch hat diese nach 20 Minuten nur erst einen Wert von 1,9 cm erreicht (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1.

	Kathodenstrom cm	Ohne Strom cm	Anodenstrom cm
Ausgangshubhöhe	2,65	2,65	2,7
Hubhöhe nach Zugabe von 0,05 γ Azetylcholin	1,7	1,7	1,7
Hubhöhe nach 20 Min.	2,5	2,35	1,9

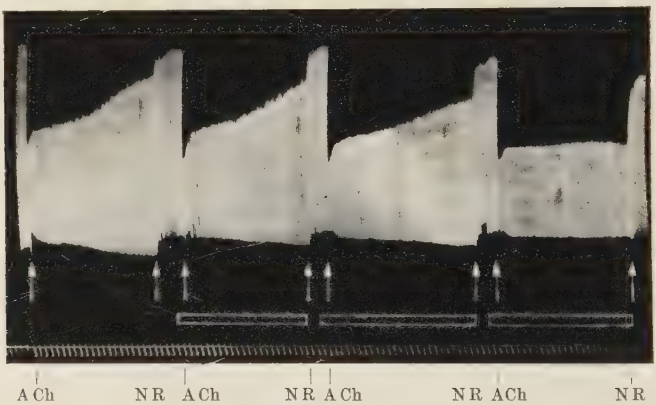


Abb. 2. ACh = Azetylcholin 0,05 γ; NR = Normalringer. [ ] Wirkungsdauer eines Anodenstromes von 0,005 bzw. 0,015 bzw. 0,030 mA. Zeitmarke: 1 Minute.

Eine Änderung der Kontraktilität erfolgte bei den angewandten Stromstärken weder durch das Einschalten des Stromes — wie aus der Abbildung zu ersehen ist —, noch durch eine längere Einwirkung desselben.

Die Abb. 2 zeigt den Einfluß verschieden starker Anodenströme auf die Azetylcholinwirkung. Die Werte für die veränderte Hubhöhe sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2.

	Ohne Strom cm	0,005 mA cm	0,015 mA cm	0,030 mA cm
Ausgangshubhöhe	2,8	2,6	2,6	2,5
Hubhöhe nach Zugabe von 0,05 γ Azetylcholin	1,15	1,1	1,0	1,0
Hubhöhe nach 20 Min.	2,4	2,2	1,9	1,3

Man sieht, wie durch die Verstärkung des Anodenstromes die Azetylcholinwirkung stark verlängert wird.

Auch die Wirkungsdauer des Adrenalins wird durch einen Gleichstrom, wie die Abb. 3 zeigt, verändert. Die positiv inotrope Wirkung des Adrenalins ist ohne Strom wie für die beiden Stromrichtungen in den ersten Minuten die gleiche. Jedoch ist die Dauer der Wirkung beim Kathodenstrom verlängert und beim Anodenstrom verkürzt gegenüber einer normalen Adrenalinzacke ohne Strom (siehe Tabelle 3). Die Stromstärke betrug auch hier 0,025 mA.

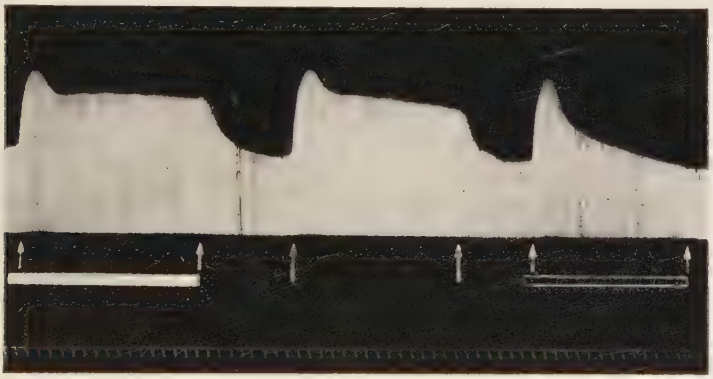


Abb. 3. Adr. = Adrenalin 0,03 γ; NR = Normalringer. ▬ Wirkungsdauer eines Kathoden- bzw. ▭ Anodenstromes von 0,025 mA. Zeitmarke: 1 Minute.

Tabelle 3.

	Kathodenstrom cm	Ohne Strom cm	Anodenstrom cm
Ausgangshubhöhe	1,15	1,15	1,15
Hubhöhe nach Zugabe von 0,03 γ Adrenalin	2,2	2,2	2,2
Hubhöhe nach 15 Min.	1,9	1,75	1,0

Besprechung.

Durch die Versuche konnte gezeigt werden, daß die Dauer der Wirkung des Azetylcholins am isolierten Froschherzen durch einen Anodenstrom verlängert und durch einen Kathodenstrom verkürzt wird. Der Grad der Wirkungsverlängerung ist abhängig von der Stromstärke. Für das Adrenalin fand sich eine Wirkungsverlängerung während des Kathodenstromes und eine Verkürzung während des Anodenstromes. Eine Erklärung der Versuchsergebnisse läßt sich auf Grund der eingangs dargelegten Vorstellungen über die Erregung und Erregbarkeit einer Zelle

ohne Schwierigkeit geben. Durch den polarisierenden Strom ist es zu einer Veränderung der Zellgrenzfläche gekommen, und zwar scheint sich der Elektrotonus infolge der Art der Anlegung der Elektroden nicht auf eine engbegrenzte Stelle, sondern auf alle an das Ventrikelcavum angrenzende Zellen auszuwirken. Dadurch gelangt ein in die Kammerflüssigkeit gegebener Wirkstoff an Muskelzellen, die in allen Teilen der Kammer eine gleichmäßige Veränderung erfahren haben. Die Beeinflussung der Zelle ist eine dreifache: 1. Durch die Erregung der Muskelzelle infolge des physiologischen Vorhofsreizes, 2. durch die Polarisation an den Zellgrenzflächen durch den galvanischen Strom mit der Änderung der Permeabilität und der Erregbarkeit der Zelle, 3. durch die Zugabe der Überträgerstoffe der Nervenwirkung: die negativ bzw. positiv bathmotrope Wirkung des Azetylcholins bzw. des Adrenalins. Durch das Azetylcholin kommt es zu einer Herabsetzung der Erregbarkeit der Muskelzelle. Diese Wirkung klingt durch die Veresterung dieses Stoffes nach einer gewissen Zeit ab. Bei einer kathodischen Polarisation hat nun die Wirkungsdauer schneller abgenommen. Nimmt man an, daß sich am Wirkungscharakter des Azetylcholins und an der Intensität des Vorhofsreizes durch die elektrische Durchströmung nichts geändert hat, muß sich die Ansprechbarkeit der Muskelzelle für diesen Stoff verändert haben, denn die erregbarkeitsdämpfende Wirkung des Azetylcholins vermag in der angewandten Menge sich nicht so stark auszuwirken wie im Versuch ohne Strom, d. h. also die Muskelzelle muß einen viel höheren Grad der Erregbarkeit gehabt haben, als es der normalen Zelle entspricht. Und es läßt sich auch zeigen, daß man bei einer entsprechenden Wahl der Stromstärke und der Azetylcholinmenge ein Bild bekommt, wo die erregbarkeitssteigernde Wirkung des Kathodenstroms so mit der negativ bathmotropen Wirkung des Azetylcholins zum Ausgleich kommt, daß sich beide Wirkungen sozusagen neutralisieren, und ein Unterschied gegenüber einer reinen Azetylcholinwirkung (ohne Strom) nicht zu erkennen ist. Das Adrenalin erfährt eine Verlängerung seiner positiv bathmotropen Wirkung während des Kathodenstromes und dies ist wiederum nur möglich, wenn die erregbarkeitsfördernde Wirkung dieses Überträgerstoffs eine besonders leicht zu erregende Muskelzelle trifft. Die anodisch polarisierte Zellmembran muß aber schwerer erregbar sein, da es zu einer starken Verlängerung der Wirkung des Azetylcholins kommt und das Adrenalin nur kurze Zeit die Erregbarkeitsherabsetzung durchbrechen kann, denn schon nach ein paar Minuten nimmt die Hubhöhe wieder stärker ab.

Der Wirkungscharakter des Azetylcholins entspricht dem eines Potentialstoffs im Sinne der Straubschen Theorie der Potentialwirkungen. Da, wie eingangs schon auseinandergelegt, nach Straub die Wirkung eines Potentialstoffs „durch den Ausgleich eines bestimmtwertigen Konzentrationspotentials in der Richtung zum Zellinnern zustande kommt", kann durch Abdichtung oder Permeabilitätsverminderung der

Zellgrenzflächen dieser Ausgleich verzögert und damit das Konzentrationspotential, das die Größe und Dauer der Wirkung bestimmt, erhöht werden. Wie oben bereits angedeutet wurde, liegt nach Gremels[12] in den Änderungen der Wirkungsbedingungen durch Zustandsstoffe eine Erklärung für Wirkungsänderungen von Potentialstoffen. Heim[13] hat am Beispiel der Narkotica- und Harnstoffwirkung auf die Membrandurchlässigkeit und die Beeinflussung der Azetylcholinwirkung sehr schön zeigen können, daß die abdichtende Wirkung der Narkotica eine Wirkungssteigerung und die Durchlässigkeitssteigerung durch Harnstoff eine Herabsetzung der Wirkungsintensität zur Folge hat. Wir haben es nun in der vorliegenden Arbeit unternommen, nicht auf chemischem, sondern auf physikalischem Wege derartige Zustandsänderungen herbeizuführen. In der Tat findet sich ja die stark verlängerte Azetylcholinwirkung unter dem die Membran abdichtenden Anodenstrom und die verkürzte Wirkung unter dem die Permeabilität der Membran steigernden Kathodenstrom.

Diese Feststellungen ergeben eine wichtige Erweiterung der Theorie der Potentialstoffwirkungen, deren Bedeutung, da ja so wichtige Substanzen wie die Überträgerstoffe der vegetativen Nervenwirkungen ihnen zugehören, sehr hoch angeschlagen werden muß. Gremels[12] hat die Vaguserregbarkeit als eine Funktion der Potentialbedingungen des Azetylcholins aufgefaßt; wir sahen die Abhängigkeit der Azetylcholinwirkung von der Erregbarkeit der Herzzellen und ihrer Beeinflussung durch die anodische und kathodische Polarisation. Wir glauben, daß diese Wechselbeziehungen für die Fragen der Physiologie der Erregung nicht ohne Bedeutung sind.

Zusammenfassung.

1. Die Dauer der negativ bathmotropen Wirkung auf die Kammer des isolierten Froschherzens wird durch einen anodisch polarisierenden Strom verlängert, durch einen kathodisch polarisierenden Strom verkürzt.

2. Der Grad der Wirkungsdauer ist von der Stromstärke abhängig.

3. Die Wirkungsänderungen werden durch die Membrantheorie der Erregung und für das Azetylcholin als dem Überträgerstoff der Vaguswirkung auch durch die Straubsche Theorie der Potentialwirkung erklärt.

[13] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 1 (1939).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Sofia.
(Direktor: Prof. Dr. D. P. Orahovats.)

Die Bedeutung der Blutgefäße und des Herzens für die Regulierung des Blutdruckes.

III. Mitteilung: Ephedrin. Wirkung auf die Blutgefäße, das Herz und den Blutdruck.

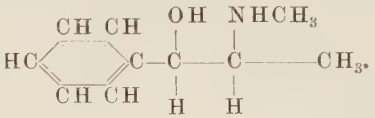
Von

T. Gotsev.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Dezember 1939.)

Wie bekannt, enthält die chinesische Pflanze Ma Huang zwei Alkaloide: das linksdrehende l-Phenyl-Methylaminomethyläthanol (l-Ephedrin) und das rechtsdrehende d-Ephedrin, auch Pseudoephedrin genannt. Im Handel befindet sich gewöhnlich das synthetisch gewonnene, optisch inaktive (racemische) Ephedrin mit folgender Strukturformel:



Man weiß, daß das Ephedrin den Blutdruck erhöht und daß diese Erhöhung viel länger dauert als nach dem Adrenalin. Das Ephedrin hat bekanntlich eine gut ausgeprägte Gefäßwirkung, die in einer Zusammenziehung der Blutgefäße zum Ausdruck kommt. Es ist allgemein anerkannt, daß das Ephedrin eine vasokonstriktorische Wirkung besitzt, und diese wird immer hervorgehoben, während seine Wirkung auf das Herz im Hintergrunde bleibt [Meyer und Gottlieb (1)]. Die Vasokonstriktion, welche nach Anwendung von Ephedrin eintritt, wird als Hauptursache für die Steigerung des Blutdruckes betrachtet.

Über den Einfluß des Ephedrins auf die Blutgefäße, die Herztätigkeit und den Blutdruck ist verhältnismäßig viel geschrieben worden, und zwar sowohl über Experimente an Tieren als auch über Beobachtungen an Menschen. Mit wenigen Ausnahmen stellen die Verfasser Konstriktion der Blutgefäße der Innenorgane, der Muskeln, der Haut usw. fest, und diese Veränderung bringt man gewöhnlich in ursächliche Verbindung mit der Veränderung im Blutdruckniveau. Was die Herztätigkeit betrifft, so finden manche Autoren eine negative Wirkung darauf, andere jedoch eine positive, und manche meinen, daß die Wirkung des Ephedrins ausschließlich auf das Herz ausgeübt wird.

So stellen z. B. Chen und Schmidt (2) eine Abnahme des Nierenvolumens bei venöser Einspritzung von Ephedrin an Hunden fest. Auf das Herz übt das Ephedrin eine stark ausgeprägte positive inotrope und chronotrope Wirkung aus. Diesen Verfassern zufolge zeitigt das Ephedrin seinen Einfluß auf die Nervenenden, und die Wirkung ist vasokonstriktorisch. Fujii (3) hat an isolierten Blutgefäßen des Kaninchenohres vasokonstriktorische Wirkung des Ephedrins beobachtet, während das Pseudoephedrin in denselben Dosen angewandt dilatorischen Effekt hatte. Chen und Meek (4) haben durch plethysmographische Untersuchungen an Tieren Erweiterung der Blutgefäße des Darmes und der Extremitäten und Zusammenziehung der Milz festgestellt. Ferner haben sie Erweiterung der Blutgefäße der Nieren nach anfänglicher Verengung beobachtet. Bei dem Herzen der kalt- und warmblütigen Tiere verursacht das Ephedrin eine Erhöhung des Schlagvolumens. Die erwähnten Verfasser nehmen an, daß die Ursache für die Erhöhung des Blutdrucks nicht von der Konstriktion der peripheren Gefäße bedingt ist. Eine der Hauptursachen hierfür ist die stimulierende Wirkung des Ephedrins auf das Herz. Barlow und Sollmann (5) finden vermittels Versuche an perfundierten Froschherzen und Trendelenburgschen Gefäßpräparaten, daß Ephedrin in Konzentrationen von $1:10^6$ bis $1:10^3$ Kontraktionen der Blutgefäße wie auch Verminderung der Amplitude, Frequenz und Förderung des Herzens hervorruft. Bei größerer Verdünnung tritt ebenfalls Konstriktion der Gefäße ein. Marcu (6) findet, unter Anwendung der plethysmographischen Methode von Danielopolu, daß sich die Wirkung des Ephedrins in Kontraktionen äußert, die sich nacheinander auf die peripheren Gefäße, die Innenorgane und die übrigen Gefäße des Körpers erstreckt. Am längsten hält die Kontraktion der Innenorgane an. Kleinere Dosen verursachen Dilatation der Gefäße, gefolgt von Konstriktion; außerdem tritt auch Verlangsamung des Pulses ein. Gradinescu und Marcu (7) stellen fest, daß die langdauernde Blutdruckerhöhung von der intensiven Konstriktion der Blutgefäße, vor allem im Splanchnicusgebiet, herrührt. Bei Anwendung größerer Dosen Ephedrin reagieren die Gefäße der Nieren mit Konstriktion, auf kleinere Dosen mit schwach ausgeprägter Dilatation. In allen Fällen wird der Milzumfang vergrößert. Durch Versuche an Hunden kommen Marcu und Gheorghiu (8, 9) zu dem Schluß, daß auch nach Ausschließung des Herzens und des Splanchnicusgebietes das Ephedrin noch eine erhebliche Steigerung des Blutdruckes hervorruft; die Ursachen hierfür kann in der Vasokonstriktion der peripheren Körpergefäße gesucht werden. Hierbei finden dieselben Verfasser, daß das Ephedrin unmittelbar auf die peripheren Gefäße wirkt. Reynolds, Chapman und Blackberg (10) finden eine Abnahme des Minutenvolumens des Herzens und Frequenzverminderung. Chen (11) stellt mit onkometrischen Untersuchungen fest, daß nur der Anfang der Blutdrucksteigerung von der peripheren Konstriktion der Blutgefäße hervorgerufen wird, während die weitere Erhöhung des Druckes durch die Zunahme der Herztätigkeit bedingt wird. Euler und Liljestrand (12) finden eine Erhöhung des Minutenvolumens durch Ephedrin. Wilson, Pilcher und Harrison (13) kommen zu der Feststellung, daß Ephedrin ein Ansteigen des Minutenvolumens verursacht und empfehlen es als herzstimulierendes Mittel. Takács (14) gelangt durch Versuche an Läwen-Trendelenburgschen Gefäßpräparaten zu dem Ergebnis, daß das Ephedrin eine stark ausgeprägte Wirkung auf die Blutgefäße hat. Schaumann (15) bemerkt an Froschpräparaten nach Trendelenburg, daß Ephedrin erst in einer Verdünnung von $1:10^4$ bis $1:10^5$ verengend wirkt. Das Ephedrin hat keine positive inotrope und chronotrope Wirkung auf das Herz. Launoy und Nicolle (16) stellten fest, daß das Ephedrin zu Anfang eine negative ino- und chronotrope Wirkung auf das Herz von Kaninchen ausübt, wonach eine positive Wirkung von längerer Dauer eintritt. Coelho (17) schließt aus elektrokardiographischen Untersuchungen an Hunden, daß Ephedrin in kleinen Dosen Bradycardie, Sinus-Vorhof und A.V.-Block, ventrikulöse Extrasystolen und Verstärkung

der *T*-Zacke verursacht. Größere Dosen rufen Tachycardie, Schädigung des ganzen Reizleistungssystems, Verkleinerung der *T*-Zacke und Flimmern hervor. An isolierten Froschherzen hat Ding (18) negative ino- und chronotrope Wirkung festgestellt, welche zu diastolischem Stillstand führt. Liljestrand und Schmidt (19) haben mit Hilfe des Plethysmographen eine zusammenziehende Wirkung des Ephedrins auf die Blutgefäße der entnervten Beine nach Einspritzung desselben in die Aorta bemerkt. Hildebrandt und Mügge (20, 21) sind der Meinung, daß die blutdrucksteigernde Wirkung des Ephedrins nicht erhöhter Herzleistung, sondern einer unmittelbaren Gefäßwirkung zuzuschreiben ist. Die Ergebnisse von Versuchen, unternommen von Suzuki (22), zeigen, daß l-Ephedrin eine peripher sympathisch erregende Wirkung ausübt. Wada (23) stellt durch plethysmographische Versuche an Hunden in Luminalnarkose eine Erweiterung des Umfanges der Milz, der Nieren, des Darmes und der Extremitäten, die nach einer vorübergehenden kurzen Abnahme des Umfanges eingetreten ist, fest. Bei wiederholter Einspritzung geht die Blutdrucksteigerung zurück und die Volumenverminderung der Organe überwiegt. Durch Anbringung von Fenstern an Kaninchenohren beobachtete Hou (24, 25) Verengerung der Arterien und Arteriolen, besonders der großen Arterien, gefolgt von abwechselnder Erschlaffung und Verengerung. Bei größeren Dosen erfolgt langdauernder völliger Verschluß der Arterien, worauf eine Phase mehrmaliger rhythmischer Erschlaffung und erneuter Kontraktion eintritt. Die Wirkung des Ephedrins bleibt auch nach Durchschneiden des Sympathicus dieselbe. Puccinelli (26) hat den Blutausfluß aus der geöffneten V. femoralis an Hunden nach Einspritzung von Ephedrin untersucht. Er stellt einen Unterschied in seiner Wirkung je nach der Dosis und der Einspritzungsstelle fest. Wenn das Ephedrin direkt in die A. femoralis eingeführt wird, so tritt immer eine Verminderung des Ausflusses ein. Kleine und mittlere Dosen, in die V. jugularis eingespritzt, verursachen Vermehrung des Ausflusses, große Dosen rufen anfänglich eine kleine Abnahme und darauf eine erhebliche Steigerung des Ausflusses hervor. Pak und Read (27) hat die Veränderungen im Volumen der Leber und des Darmes an Katzen erforscht. In den meisten Fällen trat nach der Einspritzung von 0,5 bis 5 mg/kg Ephedrin eine anfängliche Verringerung des Volumens der Leber und des Darmes ein, die parallel mit der Blutdrucksteigerung verlief; darauf folgte eine Erhöhung des Volumens derselben Organe, die gleichzeitig mit dem Absinken des Blutdruckes verlief. Nur in drei Fällen trat ein reines Anwachsen des Lebervolumens ein. Rumfelder (28) findet, daß die Präparate von der Gruppe des Ephedrins eine geringe eigene vasokonstriktorische Wirkung besitzen, dabei aber eine sensibilisierende Wirkung auf das Adrenalin ausüben. De Agazio (29) hat Perfusion an perfundiertem Krötenherz vorgenommen und findet Steigerung der Frequenz, der Hubhöhe und des Tonus als Folge erhöhten Widerstandes. Nur in Konzentrationen von 1 : 50000 bis 1 : 100000 tritt eine geringe und flüchtige positive Wirkung auf die Hubhöhe des Herzens ein. Kleinere Dosen sind unwirksam, höhere setzen die Frequenz und Hubhöhe bis zum diastolischen Stillstand herab. Meek und Seevers (30) haben EKG an nicht betäubten intakten Hunden nach Einspritzung von Ephedrin verzeichnet. Bei Dosen von 0,5—8 mg/kg haben sie zuerst Bradycardie beobachtet, der ein zweites Stadium mit ektopen Extrasystolen folgt; im dritten Stadium tritt Tachycardie mit Block ein. Bei größeren Dosen (6—20 mg pro kg) haben die Verfasser Flimmern der Kammer beobachtet. Die Untersuchungen von Sturm, Gietz und Kempte (31), die mit Hilfe des Stufentonosphygmographen an ruhenden hungrigen Menschen unternommen wurden, zeigen, daß das Ephedrin fast ausschließlich auf das Herz wirkt. Es verursacht Steigerung der Systole. Ephedrin hat nicht immer vasokonstriktorische Wirkung. Der arterielle Tonus bleibt meist unbeeinflußt. Davis (32) stellt fest, daß das intravenös angewandte Ephedrin Zusammenziehung der Milz verursacht. Das Oxyephedrin und das Ephedrinchlorhydrat erhöhen nach Oremus (33) das Schlagvolumen und das Minutenvolumen des Herzens bei den Hunden.

Der Zweck vorliegender Arbeit war, die Wirkung des intravenös, intraarteriell und intraaortal eingeführten Ephedrins auf die Blutgefäße, die Herztätigkeit und den Blutdruck zu erforschen, besonders aber das Verhältnis festzustellen, das zwischen den im Zustand der Blutgefäße eintretenden Veränderungen einerseits und denjenigen im Niveau des Blutdruckes andererseits besteht, wie auch zu ermitteln, welcher der Hauptfaktor ist, der die Veränderungen im Blutdruck bedingt — ob dies die Veränderungen im Zustande der Blutgefäße sind, wie allgemein angenommen wird, oder die in der Herztätigkeit eintretenden Veränderungen.

Die Versuche wurden an 33 Hunden beiderlei Geschlechts und von mittlerer Größe — 6—16 kg schwer — ausgeführt. Zur Narkose wurde in den meisten Fällen Luminalnatrium und einige Male Morphinäther verwendet.

Die Technik war dieselbe wie die bei den Versuchen mit Histamin und Veritol angewandte (I. und II. Mitteilung). Die Veränderungen im Umfang der Innenorgane wurden mit Hilfe der Onkographen von Orahovats und Popoff, diejenigen der Extremitäten vermittels des eigens dafür hergestellten Plethysmographen von entsprechender Größe und Form untersucht. Die Onkographen und der Plethysmograph werden mit angewärmter Ringerlösung angefüllt. Die in den Organen eintretenden Veränderungen werden (mit Hilfe von Luftübertragung und der Kapsel von Marey) gleichzeitig mit den im Blutdruck vor sich gehenden Veränderungen registriert. Die letzteren werden von der A. carotis oder der A. femoralis mit Hilfe des offenen Quecksilbermanometers von Ludwig verzeichnet. Die Technik der Eviscerierung der Tiere wurde in der I. Mitteilung, diejenige der Verkürzung des großen Blutkreislaufes in der Zeitschr. f. d. ges. exper. Medizin **100**, 81 (1936) beschrieben. Alle Versuche wurden am ganzen Tier vorgenommen. Zur Anwendung gelangte Racedrin „Bayer" und Ephetonin „Merck". Der zu erforschende Stoff wurde in die V. jugularis ext., V. femoralis, A. femoralis, Aorta abdominalis und Aorta thoracica des Tieres eingespritzt.

Ergebnisse.

Die Veränderungen im Blutdruck und im Zustand der Blutgefäße, die nach Einspritzen von Ephedrin eintreten, hängen vor allem von der Stelle der Injizierung ab. Wenn Ephedrin venös — in die V. jugularis ext. oder V. femoralis — eingeführt wird, treten andere Veränderungen auf als nach Einspritzung derselben Dosis Ephedrin in die A. femoralis oder in die Aorta.

A. Intravenöse Einführung von Ephedrin.

1. Blutdruck.

Die intervenöse Anwendung von Ephedrin in Dosen von über 1 mg pro kg Körpergewicht verursacht verhältnismäßig langsam eintretende Blut-

drucksteigerung, die im Verlaufe von 1—1½—2 Minuten ihren Höhepunkt erreicht; auf diesem Niveau verharrt der Blutdruck 20—60 Minuten, wonach er allmählich bis zum Ausgangsniveau herabsinkt. Diesbezüglich ähnelt die Wirkung des Ephedrins auf den Blutdruck in hohem Grade der Wirkung des Veritols, mit dem Unterschied jedoch, daß das Ephedrin in den meisten Fällen die Amplitude des Blutdruckes bedeutend erhöht (Abb. 1). Von dem Augenblicke der Einspritzung der Lösung in die Vene

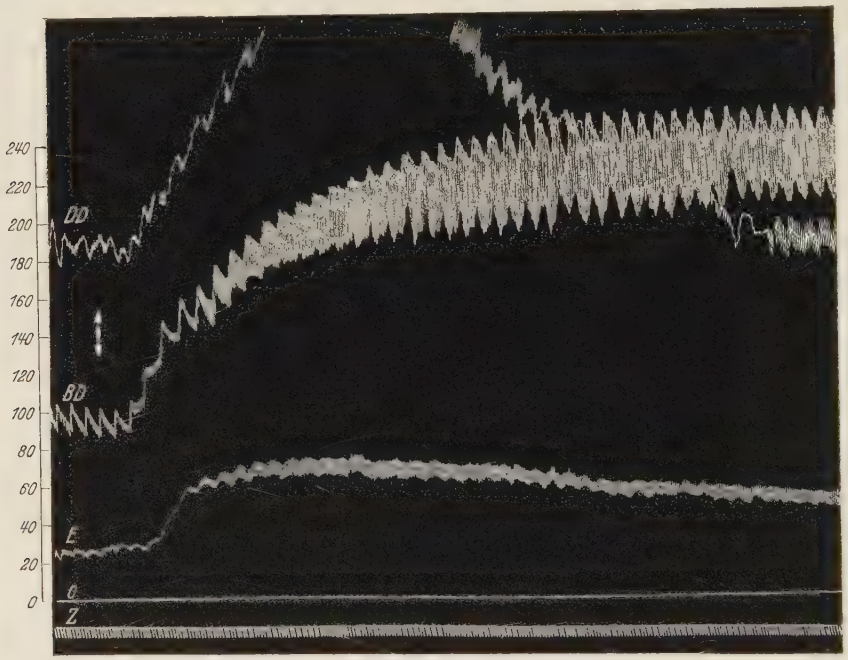


Abb. 1. 26. VIII. 1939. Hund, 16 kg, ♂. DD = Dünndarmvolumen, BD = Blutdruck in der A. carotis, E = Extremitätsvolumen, 0 = Blutdrucknullniveau, Z = Zeit in Sek. Bei ↕ wurden 5 cg Ephedrin „Bayer" in die V. jugularis ext. injiziert.

des Tieres bis zum Beginn der Blutdrucksteigerung verstreichen gewöhnlich nur einige - - 4 -6 - Sekunden. Eine lange Latenzzeit, wie sie regelmäßig bei der Einspritzung von Veritol beobachtet wird, wurde hier niemals bemerkt. Wiederholtes Einspritzen von Ephedrin bei ein und demselben Tier verursacht geringere Steigerung des Blutdruckes.

Wenn Ephedrin einem Tier injiziert wird, dem vorher einer der folgenden Stoffe: Adrenalin, Sympatol, Histamin oder Acetylcholin eingespritzt worden ist, so zeigt der Blutdruck entweder nur eine unbedeutende Erhöhung oder eine vorübergehende leichte Herabsetzung, gefolgt von leichter Steigerung, oder aber es tritt nur Absinken des Blutdruckes ein (Abb. 3b und 6). Je schneller nach dem Vorübergehen der Wirkung des vorher eingespritzten Stoffes Ephedrin verabfolgt wird, desto stärker

ist das Absinken des Blutdruckes ausgeprägt. Wird das Ephedrin einige Minuten später eingespritzt, so erfolgt nur eine leichte Steigerung ohne Absinken. Eine Umkehrung der Wirkung des Ephedrins auf den Blutdruck wurde von Raymond Hamet (34) bei Hunden beobachtet, wenn vorher durch Verschluß der Carotiden eine starke Erhöhung des Blutdruckes erreicht worden war.

2. Blutgefäße.

a) Milz. Das Ephedrin verursacht eine starke und langwährende Zusammenziehung der Milz, die schnell eintritt und in kurzer Zeit ihren Höhepunkt erreicht. Manchmal geht der Verringerung des Umfanges des Organs eine kurzdauernde vorübergehende Erweiterung voraus, wie sie in einigen Fällen nach der Anwendung von Adrenalin eintritt (Abb. 2). Die Milz bleibt lange Zeit zusammengezogen, viel länger als dies bei dem Adrenalin der Fall ist, und in dieser Beziehung ähnelt die Wirkung des Ephedrins derjenigen des Veritols. Manchmal bleibt die Milz während der ganzen Zeit der Blutdruckerhöhung zusammengezogen, und erst, wenn der Blutdruck auf sein Ausgangsniveau absinkt, entspannt sich die Milz bis zu ihrer vorherigen Größe. In vielen Fällen jedoch nimmt die Milz ihren ursprünglichen Umfang wieder an und behält ihn bei, bevor noch der Blutdruck sein Ausgangsniveau erreicht hat. Die Entspannung der Milz geht allmählich vor sich, gewöhnlich im Verlaufe von 2—4 Minuten. Es muß erwähnt werden, daß die Zusammenziehung der Milz, wenn ihr nicht eine Umfangerhöhung derselben vorausgeht, 2—3 Sekunden, nachdem der Blutdruck eine leichte Steigerung aufzuweisen beginnt, eintritt. In keinem einzigen Falle kommt die Zusammenziehung der Milz der Erhöhung des Blutdruckes zuvor. Auf Abb. 2 ist ein Fall dargestellt, bei dem die starke Umfangverringerung des Organs äußerste

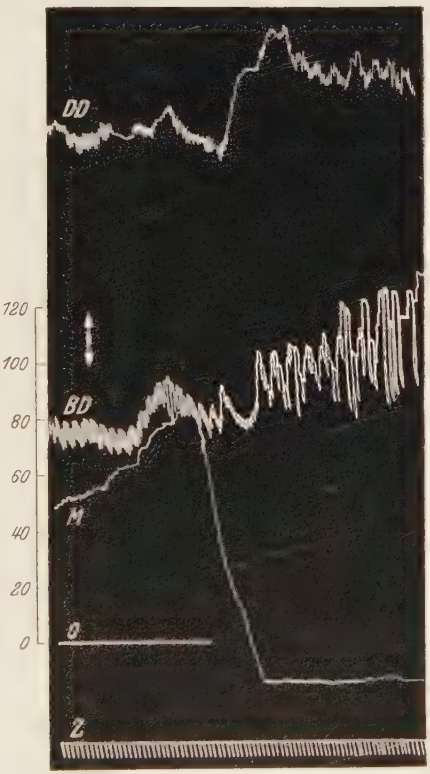


Abb. 2. 3. VIII. 1939. Hund, 9 kg. ♂. DD = Dünndarmvolumen, BD = Blutdruck in der A. carotis, M = Milzvolumen, 0 = Blutdrucknullniveau, Z = Zeit in Sek. Bei ↕ wurden 3 cg Ephetonin „Merck“ in die V. jugularis ext. injiziert.

Zusammenziehung der Kapsel von Marey hervorruft, derzufolge der Hebel der letzteren eine horizontale Linie beschreibt. Die Veränderungen im Umfange der Milz können bei geöffnetem Bauch unmittelbar ohne jede Apparatur beobachtet werden. Nach Einspritzung von Ephedrin nimmt der Umfang des Organs wesentlich ab; dieses wird uneben und körnig.

b) Dünndarm. Bei den Blutgefäßen des Dünndarms verursacht das Ephedrin eine passive Erweiterung. Diese beginnt entweder gleichzeitig mit dem Einsetzen der Blutdrucksteigerung oder 2—3 Sekunden später. Bezüglich der Dauer dieser Erweiterung kann gesagt werden, daß sie nicht so lange anhält wie die Veränderung im Niveau des Blutdruckes. Gewöhnlich geht die Erweiterung der Gefäße vorüber und der Dünndarm nimmt wieder seinen normalen Umfang an, bevor noch der Blutdruck angefangen hat zu sinken. Auf Abb. 1 ist ein Fall wiedergegeben, bei dem sich sofort, nachdem die Blutdrucksteigerung begonnen hat, die Blutgefäße des Dünndarms erweitern, und dies verläuft parallel mit der Erhöhung des Blutdruckes. Die Erweiterung ist in diesem Falle ziemlich stark ausgeprägt, wodurch sich die Registrierkapsel nach oben wölbt und der Hebel die Grenzen des Papiers des Kymographen überschreitet, so daß der Höhepunkt der Erweiterung nicht verzeichnet ist. Danach nimmt die Erweiterung der Blutgefäße des Dünndarms allmählich ab, bis der Umfang des Organs sein ursprüngliches Niveau erreicht, das es auch ferner beibehält, trotzdem der Blutdruck immer noch hoch ist. In den Fällen, in denen die Erweiterung der Blutgefäße des Dünndarms gut ausgeprägt ist, kann sie auch unmittelbar bei geöffnetem Bauch des Tieres beobachtet werden. In keinem einzigen der von uns untersuchten Fälle trat eine Zusammenziehung der Blutgefäße ein.

c) Nieren. Bei den Blutgefäßen der Nieren ruft das Ephedrin ebenfalls eine passive Erweiterung hervor, die parallel mit der Erhöhung des Blutdruckes verläuft. Die Dilatation der Gefäße beginnt gleichzeitig mit der Blutdrucksteigerung. In den meisten Fällen dauert die Erweiterung der Gefäße noch geraume Zeit an, auch nachdem der Blutdruck sein höchstes Niveau erreicht hat (Abb. 3a). Nur in zwei Fällen beobachteten wir vorübergehende schwach ausgeprägte und kurzdauernde Zusammenziehung der Blutgefäße, gefolgt von starker und langanhaltender Erweiterung derselben. In keinem Falle haben wir nur Zusammenziehen der Gefäße beobachtet — weder bei der Anwendung kleiner, noch beim Gebrauche großer Dosen Ephedrin.

In denjenigen Fällen, in denen der Einspritzung von Ephedrin die Einführung eines anderen Stoffes vorausging und der Blutdruck, anstatt zu steigen, sank, war dies von Zusammenziehung der Nierengefäße begleitet (Abb. 3b). Auch in diesen Fällen trat eine rein passive Veränderung in dem Zustand der Blutgefäße, bedingt durch die Veränderung im Niveau des Blutdruckes, ein.

d) Extremitäten. Die Blutgefäße der Extremitäten werden durch Ephedrin erweitert. Auch hier beginnt die Erweiterung gleichzeitig mit

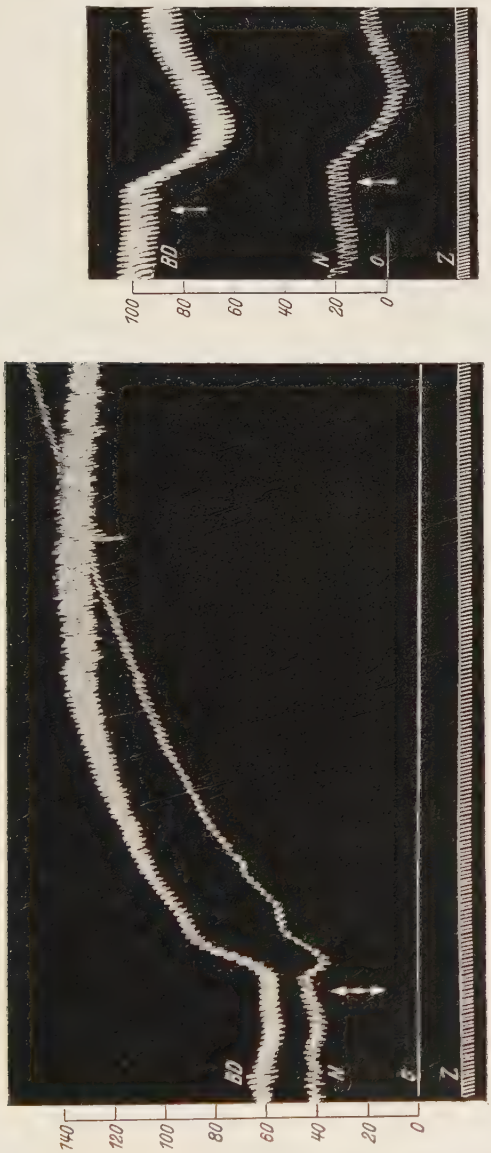


Abb. 3a. 29. VIII. 1939. Hund. 9 kg. ♂. BD = Blutdruck in der A. carotis, N = Nierenvolumen, O = Blutdrucknullniveau, Z = Zeit in Sek. Bei ▲ wurden 3 cg Ephedrin „Bayer“ in die V. jugularis ext. injiziert.

Abb. 3b. Derselbe Versuch. Bei ▲ wurden 3 cg Ephedrin „Bayer“ in die V. jugularis ext. injiziert. 5 Minuten vorher wurde 1 ccm Sympatol eingespritzt und vor diesem 3 cg Ephedrin (siehe Abb. 3a.)

der Steigerung des Blutdruckes und hält gewöhnlich so lange an, bis der Blutdruck auf sein Ausgangsniveau absinkt (Abb. 1). Zusammenziehung der Blutgefäße der Extremitäten haben wir in keinem einzigen Falle beobachtet.

B. Intraarterielle Einspritzung von Ephedrin.

1. Blutdruck.

In denjenigen Fällen, in denen das Ephedrin in ein arterielles Gefäß, z. B. in die Aorta abdominalis oder in die A. femoralis eingeführt wird, verändert sich der Blutdruck auf dieselbe Weise wie bei der intravenösen Injektion. Ein und dieselbe Dosis Ephedrin verursacht die gleiche Erhöhung des Blutdruckes, unabhängig davon, ob sie in eine Vene oder in eine Arterie eingespritzt wurde. Einen gewissen Unterschied bemerkt man nur bezüglich der Zeit, die vom Augenblicke der Einspritzung des Ephedrins bis zum Beginn der Blutdrucksteigerung verstreicht. Wenn das Ephedrin in eine Arterie eingespritzt wird, so ist die Latenzzeit länger als bei venöser Verabfolgung, und zwar um so länger, je näher die Arterie zum Herzen liegt. Am schnellsten tritt die Blutdruckerhöhung ein, wenn das Ephedrin in die nahe dem Herzen befindliche Vene eingespritzt wird.

So ist z. B. nach Einspritzung von Ephedrin in die V. jugularis ext. beim Tiere diese Latenzzeit am kürzesten — nur 4—6 Sekunden. Wenn jedoch das Ephedrin in die V. femoralis eingeführt wird, so ist diese Zeit länger - 6—9 Sekunden — und bei Injektion in die A. femoralis noch länger — sie kann 12 -16 Sekunden erreichen. Am längsten ist die Latenzzeit bei Einspritzung des Ephedrins in die Aorta abdominalis oder die Aorta thoracica, wo sie 18—30 Sekunden dauern kann. Es muß hervorgehoben werden, daß bei Verabfolgung von Ephedrin in ein und dasselbe Blutgefäß die Latenzzeit vor allem von der Häufigkeit der Herztätigkeit und vom Blutdruckniveau abhängt. Je beschleunigter die Herztätigkeit und je höher der Blutdruck ist, desto kürzer ist die Latenzzeit.

Bei intraarterieller Anwendung von Ephedrin verursacht wiederholtes Einspritzen von Ephedrin schwächere Steigerung des Blutdruckes, wie dies auch bei venöser Einführung beobachtet wird. Außerdem bewirkt das Ephedrin in denjenigen Fällen, in denen in die Arterie vorher einer der oben erwähnten Stoffe, nämlich Adrenalin, Sympatol, Histamin oder Azetylcholin eingespritzt wurde, ein Absinken des Blutdruckes oder vorübergehende leichte Senkung, gefolgt von leichter Erhöhung oder aber nur eine schwach ausgeprägte Steigerung, d. h., es tritt dieselbe Veränderung wie in den Fällen ein, in denen der betreffende Stoff in eine Vene injiziert worden ist.

2. Blutgefäße.

Die Veränderungen, die in den Blutgefäßen der Bauchorgane und der Extremitäten nach intraarterieller Anwendung von Ephedrin eintreten, sind verschieden von den bei venöser Einspritzung erfolgenden, trotzdem sich der Blutdruck in beiden Fällen auf ein und dieselbe Weise verändert.

Wenn man Ephedrin in die A. femoralis einführt, so ziehen sich die Blutgefäße der entsprechenden Extremität zusammen, während die Blut-

gefäße der anderen Extremitäten sich erweitern. Die Zusammenziehung der Blutgefäße der Extremität erfolgt kurz nach der Einspritzung in die Arterie — 3—5 Sekunden —, wird allmählich stärker und dauert eine gewisse Zeit — 2—4 Minuten —, worauf die Blutgefäße sich langsam entspannen, um zu ihrem ursprünglichen Zustand zurückzukehren, ehe noch der Blutdruck zu fallen begonnen hat. Es muß hervorgehoben werden, daß die Erweiterung der Blutgefäße der anderen Extremitäten einige Sekunden (4—6), nachdem die Blutgefäße der einen Extremität begonnen haben sich zusammenzuziehen, einsetzt, und daß diese Erweiterung gleichzeitig mit der Blutdrucksteigerung einsetzt und verläuft. Man beobachtet einen Unter-

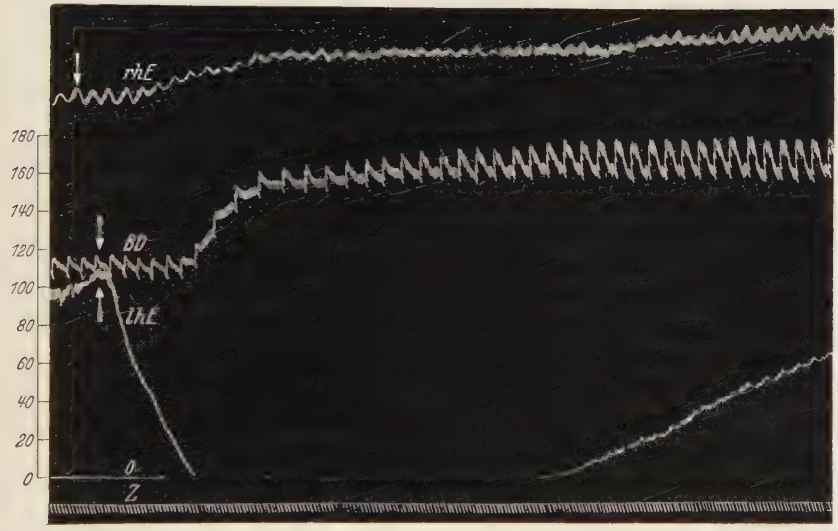


Abb. 4. 20. XI. 1939. Hund, 16 kg, ♂. rhE = rechte hintere Extremität, BD = Blutdruck in der A. carotis, lhE = linke hintere Extremität, 0 = Blutdrucknullniveau, Z = Zeit in Sek. Bei ▼ wurden 2 cg Ephedrin „Bayer" in die linke hintere Extremität injiziert.

schied im funktionellen Zustand der Blutgefäße der Extremitäten: diejenigen der einen Extremität ziehen sich zusammen, während die der anderen Extremitäten sich erweitern.

Abb. 4 stellt das Ergebnis eines typischen Versuchs an einem Hunde dar, an dessen linker Extremität 2 cg Ephedrin eingespritzt wurde. 3 Sekunden nach der Einspritzung tritt stark ausgeprägte und langdauernde Zusammenziehung der Blutgefäße derselben Extremität ein. 18 Sekunden danach, d. h. 22 Sekunden nach der Verabfolgung des Ephedrins, erfolgt Blutdrucksteigerung und gleichzeitig damit Erweiterung der Blutgefäße der rechten hinteren Extremität. Die Erweiterung verläuft gleichzeitig mit der Blutdruckerhöhung.

Diese Fälle sind auch in anderer Hinsicht von Interesse, und zwar, weil trotz der starken Zusammenziehung der Blutgefäße, die unmittelbar nach

der arteriellen Anwendung von Ephedrin eintritt, der Blutdruck unverändert auf einem Niveau im Verlaufe von ganzen 18 Sekunden verharrt. Außerdem ist die Tatsache zu beachten, daß sich die zusammengezogenen Blutgefäße allmählich bis zu ihrem vorherigen ursprünglichen Niveau entspannen, ohne daß dabei irgendeine Blutdrucksenkung erfolgt. Trotzdem die Blutversorgung der linken hinteren Extremität normalisiert wird, behält der Blutdruck ein hohes Niveau bei.

In denjenigen Fällen, in denen das Ephedrin in den Anfangsteil der Aorta abdominalis eingeführt wird, erfolgt Zusammenziehung der Milz, Zusammenziehung der Blutgefäße des Dünndarms, der Nieren und der hinteren Extremitäten und Erweiterung der Blutgefäße der vorderen Extremitäten.

Aus dem Dargelegten geht klar hervor, daß die Wirkung des Ephedrins auf die Blutgefäße von der Injizierungsstelle abhängt: venös angewendet tritt Erweiterung der Blutgefäße, arteriell angewendet tritt Zusammenziehung derjenigen Blutgefäße, zu denen das Ephedrin direkt gelangt, und Erweiterung in den Gefäßen, zu denen es über das Herz gelangt, ein. Die Zusammenziehung setzt sofort ein, d. h. 3—5 Sekunden nach der Einspritzung, die Erweiterung erfolgt später — sie beginnt gleichzeitig mit der Blutdrucksteigerung und verläuft parallel mit ihr. Der Blutdruck beginnt nicht sofort nach der Zusammenziehung der Blutgefäße zu steigen, sondern nach einer gewissen Zeitspanne, die an erster Stelle davon abhängt, welchen Weg der zugeführte Stoff zurückzulegen hat, bis er zum Herzen gelangt, und in zweiter Linie von der Schnelligkeit der Herztätigkeit. Einen je längeren Weg die Ephedrinlösung bis zur Erreichung des Herzens zurückzulegen hat, desto mehr Zeit verstreicht bis zum Beginn der Blutdruckveränderung und umgekehrt. Ebenso setzt die Blutdrucksteigerung um so früher ein, je beschleunigter die Herztätigkeit ist.

Wenn der Einführung von Ephedrin in die A. femoralis die Einspritzung einer der oben erwähnten vier Stoffe vorausgeht und sich hierdurch die Wirkung des Ephedrins auf den Blutdruck verändert und der letztere, anstatt zu steigen, fällt, so erleiden die Blutgefäße der vier Extremitäten nur passive Veränderungen, die parallel mit der Veränderung im Blutdruckniveau verlaufen.

Die Wirkung des Ephedrins auf den Blutdruck bei eviscerierten Tieren.

Bei venöser Verabfolgung von Ephedrin tritt in drei von den Organen, die wir untersuchten, Erweiterung der Blutgefäße ein, nämlich im Dünndarm, in den Nieren und in den Extremitäten. Diese Gefäßerweiterung setzt zu der Zeit ein, wenn der Blutdruck steigt. Je mehr sich der Blutdruck erhöht, desto stärker ist auch die Erweiterung der Blutgefäße ausgeprägt. Die Milz weist regelmäßig, ohne Ausnahme, eine starke und langdauernde Zusammenziehung auf. Von den Veränderungen in den vier

Organen kann nur die Veränderung in der Milz in ursächliche Verbindung mit der Veränderung im Blutdruck gebracht werden.

Nun taucht die Frage auf, welchen Anteil an der durch Ephedrin hervorgerufenen Blutdruckveränderung die übrigen Bauchorgane haben. Möglicherweise zeigen einige von uns nicht untersuchten Organe eine stark ausgeprägte Konstriktion, die imstande wäre, die Steigerung des Blutdruckes zu verursachen, trotz der in den übrigen Gefäßgebieten eintretenden starken Dilatation. Da wir keine Untersuchungen an anderen Innenorganen haben, so erforschten wir, um auf andere Weise festzustellen, welche Bedeutung die Blutgefäße der Bauchorgane überhaupt für die Erhöhung des Blutdruckes haben, die Wirkung des Ephedrins an eviscerierten Tier. Zu diesem Zwecke wurden die Bauchorgane — der Magen, Dünn- und Dickdarm, die Bauchspeicheldrüse, die Milz und die beiden Nieren — herausgenommen; außerdem wurde der Blutkreislauf der Leber wie auch der im kleinen Becken gelegenen Organe durch Unterbindung der zu- und abführenden Blutgefäße ausgeschlossen. In allen Fällen der Ephedrineinspritzung trat, je nach der angewandten Dosis, eine entsprechende Erhöhung des Blutdruckes ein, unabhängig davon, daß die Bauchorgane herausgenommen waren. Das Ephedrin erhöht den Blutdruck bei ganzem wie auch bei eviszeriertem Tier auf ein und dieselbe Weise.

Diese Versuche zeigen, daß nicht die Blutgefäße der Bauchorgane der Hauptfaktor sind, der die Veränderungen im Niveau des Blutdruckes bedingt.

Wirkung des Ephedrins auf den Blutdruck bei Tieren mit verkürztem großen Blutkreislauf.

Durch Versuche an einigen Tieren wurde die Wirkung des Ephedrins auf Tiere untersucht, bei denen vorher eine Verkürzung des großen Blutkreislaufes derart, daß von ihm nur derjenige der Bauchorgane erhalten blieb, vorgenommen worden war. In diesen Fällen fließt das Blut nur durch die Lunge und die Bauchorgane, nicht aber durch die übrigen Teile des Körpers.

Bei Einspritzung von Ephedrin tritt in solchen Fällen wieder eine Blutdrucksteigerung ein, ohne daß irgendein besonderer Unterschied in seiner Wirkung auf den Blutdruck zu bemerken wäre; daraus geht hervor, daß als Ursache für die Veränderung im Blutdruck die Veränderungen in den Blutgefäßen nicht in Frage kommen.

Die Wirkung des Ephedrins auf die Herztätigkeit bei ganzem Tier.

Mit Hilfe des Tonographen, der, ohne Öffnen des Brustkorbes, durch einen der Zwischenrippenräume in die linke Kammer eingeführt worden war, wurden gleichzeitig die Veränderungen im Tonogramm der linken Kammer und diejenigen, die im Blutdruckniveau eintraten, untersucht.

Zu diesem Zwecke registrierte man vorher das Ausgangsniveau des Blutdruckes und der Tonogrammhöhe, wonach man in die V. jugularis des Tieres die festgesetzte Dosis Ephedrin einspritzte.

Zwischen den Veränderungen im Blutdruck und denjenigen in der Herztätigkeit, eingetreten nach intravenöser Einführung von Ephedrin, beobachtete man in allen Fällen ein vollkommenes Abhängigkeitsverhältnis. Die Erhöhung des Blutdruckes ist von Erhöhung und Beschleunigung

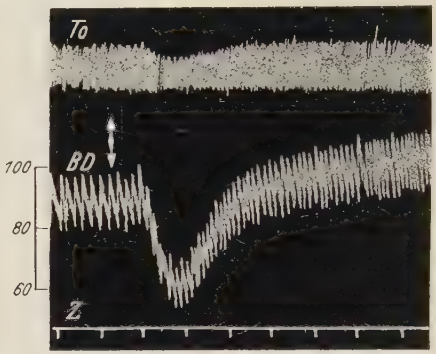


Abb. 6. 14. VIII. 1939. Hund, 16 kg, ♀. To = Tonogramm der linken Kammer, BD = Blutdruck in der A. carotis, Z = Zeit: 10 Sek. Bei ↕ wurden 2,5 cg Ephetonin „Merck" in die V. jugularis ext. injiziert. Vorher wurde 0,1 mg Histamin „Roche" in dieselbe Vene injiziert.

Abb. 5. 28. XI. 1939. Hund, 11 kg, ♂. To = Tonogramm der linken Kammer, BD = Blutdruck in der A. carotis, 0 = Blutdrucknullniveau, Z = Zeit in Sek. Bei ↕ wurden 2,5 cg Ephedrin „Bayer" in die V. jugularis injiziert.

der Herztätigkeit begleitet. Wenn der Blutdruck sein Maximum erlangt, dann erreicht auch die vom Herzen geleistete Arbeit ihren Höhepunkt. Das allmähliche Absinken des Blutdruckes ist von allmählicher Verringerung der Herztätigkeit begleitet, welch letztere zu ihrem normalen Niveau erst dann wieder zurückkehrt, wenn der Blutdruck auf sein Ausgangsniveau sinkt. Man bemerkt einen völligen Gleichlauf zwischen den Veränderungen in der Herztätigkeit und denjenigen im Niveau des Blutdruckes.

Ein typischer Fall ist auf Abb. 5 dargestellt, wo einem 11 kg schweren Hund 2,5 cg Ephedrin in die V. jugularis ext. eingespritzt worden ist. Man sieht, daß vor der Einspritzung der Blutdruck ein dauerndes Niveau hatte und die Höhe des Tonogramms gleichmäßig war. Nach der Verabfolgung von Ephedrin erfolgt Erhöhung des Blutdruckes, begleitet von Steigerung der Tonogrammhöhe und Beschleunigung der Herztätigkeit.

Eine solche Abhängigkeit des Blutdruckes von der Herztätigkeit bemerkt man in allen Fällen, sowohl bei der Verwendung kleiner, wie auch bei dem Gebrauche größerer Dosen.

In denjenigen Fällen, in denen Ephedrin, wie weiter oben erwähnt wurde, Absinken des Blutdruckes veranlaßt, geht diese Veränderung im Niveau des letzteren mit Abnahme der Herztätigkeit zusammen. Auf Abb. 6 sehen wir einen solchen Fall, in dem vorher 0,1 mg Histamin „Roche" eingespritzt worden ist. Das Sinken des Blutdruckes ist von einer Abnahme der Tonogrammhöhe begleitet.

Die Ergebnisse der Versuche bestätigen die von Chen und Meek (4) und Sturm, Gietz und Kempte (31) geäußerte Ansicht, daß das Ephedrin fast ausschließlich auf das Herz wirkt.

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den bisher dargelegten Ergebnissen ist ersichtlich, daß die Veränderungen, die im Zustande der Blutgefäße nach intravenöser Einspritzung von Ephedrin eintreten, die Erhöhung des Blutdruckes, der gewöhnlich ein verhältnismäßig hohes Niveau erreicht, auf dem er lange Zeit verharrt, nicht erklären können. Vor allem erfolgen die Veränderungen in den Blutgefäßen nicht vor, sondern nach Beginn der Blutdrucksteigerung, und darum können sie mit letzterem nicht in ursächlichen Zusammenhang gebracht werden. Unabhängig hiervon tritt bei intravenöser Verabfolgung von Ephedrin in allen Fällen Erweiterung der Blutgefäße des Dünndarmes, der Nieren und der Extremitäten ein. Eine Ausnahme wird nie beobachtet. Wenn die Veränderung im Zustand der Blutgefäße die Ursache für die Veränderung im Blutdruck wäre, so müßte die Erhöhung des Blutdruckes von Zusammenziehung der Blutgefäße und nicht von Erweiterung begleitet sein, oder, sowie eine solche einträte, müßte sie Absinken des Blutdruckes nach sich ziehen. In den Fällen, in denen der Einspritzung von Ephedrin diejenige eines anderen Stoffes vorhergeht und der Blutdruck, anstatt zu steigen, absinkt, tritt eine Abnahme des Volumens des untersuchten Organs ein.

Es ist offensichtlich, daß das Ephedrin überhaupt bei intravenöser Anwendung passive Veränderungen in den Blutgefäßen hervorruft, die von den Veränderungen im Blutdruck herrühren: Erhöhung des Blutdruckes verläuft mit passiver Erweiterung der Blutgefäße, Absinken des Blutdruckes verläuft mit passiver Zusammenziehung derselben. Eine Ausnahme diesbezüglich macht nur die Milz, die sich in allen Fällen zusammenzieht.

Die bei intraarterieller und intraaortaler Einspritzung im Blutdruck erfolgenden Veränderungen beginnen nach einer Zeitspanne, die ausschließlich von der Zeit abhängt, zu der das Ephedrin das Herz erreicht. Je schneller das Ephedrin zum Herzen gelangt, desto eher fängt der Blutdruck sich zu ändern an. Wenn die Veränderung im Zustand der Blutgefäße der Hauptfaktor wäre, der den Blutdruck reguliert, so mußte bei arterieller

und aortaler Anwendung von Ephedrin der Blutdruck unmittelbar nach der Zusammenziehung der Blutgefäße steigen, und nicht nach einem verhältnismäßig langen Zeitraum. Bei diesen Arten der Anwendung von Ephedrin müßte die Veränderung im Blutdruck nicht langsamer, sondern schneller erfolgen als bei der intravenösen Einspritzung, und zwar aus zwei Gründen: 1. weil bei dieser Anwendung das Ephedrin zuerst in die Gefäße des großen Blutkreislaufs gerät, ohne durch den Lungenkreislauf zu gehen, wie dies bei der intravenösen Verabfolgung der Fall ist, und 2. weil in allen diesen Fällen Zusammenziehung der Blutgefäße eintritt und nicht Erweiterung wie bei der venösen Anwendung.

Hier ist die Tatsache interessant, daß die Zusammenziehung eines großen Teiles der Blutgefäße des großen Blutkreislaufes nicht imstande ist, den Blutdruck zu verändern. Die Veränderung tritt erst dann ein, wenn das Ephedrin das Herz erreicht.

Andererseits entsprechen die Veränderungen, die in der Herztätigkeit vor sich gehen, völlig den im Blutdruck eintretenden. Es besteht eine völlige ursächliche Abhängigkeit der Veränderungen im Blutdruckniveau von denjenigen in der Herztätigkeit. Die Zunahme der Herztätigkeit hat Erhöhung des Blutdruckes im Gefolge; allmähliche Normalisierung der Herztätigkeit führt zu allmählicher Senkung des Blutdruckes bis zum normalen Niveau. Die Abnahme der Herztätigkeit, die in den weiter oben beschriebenen Fällen beobachtet wird, hat Sinken des Blutdruckes zur Folge; die darauffolgende Besserung der Herztätigkeit führt zu Besserung des Blutdruckes. In allen Fällen wird eine vollkommene Abhängigkeit der Veränderungen im Blutdruck von denjenigen in der Herztätigkeit beobachtet.

Es ist folglich klar, daß die Hauptursache für die Veränderungen im Niveau des Blutdruckes die Veränderungen in der Herztätigkeit bilden. Ephedrin wirkt hauptsächlich auf das Herz, während die in den Blutgefäßen der meisten Gefäßgebiete eintretenden Veränderungen passiv sind und das Blutdruckniveau nicht verändern können.

Zusammenfassung.

1. Bei intravenöser und intraarterieller Einspritzung verursacht das Ephedrin die bekannte Erhöhung des Blutdruckes, die allmählich anfängt und nach 1—2 Minuten das Höchstniveau erreicht, das etwa 20—60 Minuten beibehalten wird. In den meisten Fällen nimmt die Amplitude des Blutdruckes zu. Das Absinken des Blutdruckes bis zum normalen Niveau geht allmählich vor sich. Die Zeit, die vom Augenblicke der Verabfolgung des Ephedrins an bis zum Beginn der Blutdrucksteigerung verfließt, beträgt nur einige Sekunden und hängt von der Stelle der Einspritzung ab; sie beträgt mehr, wenn man in eine Arterie, weniger, wenn man in eine Vene, und am wenigsten, wenn man in eine dem Herzen naheliegende Vene einspritzt.

In denjenigen Fällen, in denen man dem Tier vorher Adrenalin, Sympatol, Histamin oder Azetylcholin eingespritzt hat, erfolgt entweder Absinken des Blutdruckes oder vorübergehendes leichtes Sinken, gefolgt von leichtem Steigen, oder aber nur schwach ausgeprägte Erhöhung. Je schneller nach dem vorher eingeführten Stoffe Ephedrin eingespritzt wird, desto stärker ist das Absinken des Blutdruckes ausgeprägt.

2. Die Wirkung des Ephedrins auf die Blutgefäße des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten hängt von der Stelle der Einspritzung ab. Wird das Ephedrin intravenös eingeführt, so tritt eine Erweiterung der Blutgefäße des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten ein. Sehr selten erfolgt eine vorübergehende, leichte und kurzdauernde Zusammenziehung der Blutgefäße der Nieren, gefolgt von stark ausgeprägter Erweiterung. Nur Zusammenziehung der Blutgefäße des Dünndarms, der Nieren und der Extremitäten wurde nicht beobachtet.

Wenn Ephedrin in den Anfangsteil der Aorta abdominalis eingespritzt wird, so erfolgt eine Zusammenziehung der Blutgefäße des Dünndarms, der Nieren und der hinteren Extremitäten und Erweiterung der Blutgefäße der vorderen Extremitäten. Injiziert man das Ephedrin in die A. femoralis der einen Extremität, so tritt Zusammenziehung der Gefäße derselben Extremität und Erweiterung der Blutgefäße in den übrigen drei Extremitäten ein. Die Erweiterung der Blutgefäße der Extremitäten erfolgt nicht gleichzeitig mit der Zusammenziehung der Gefäße der anderen Extremitäten, sondern nach einer gewissen Zeitspanne. Die Erweiterung der Blutgefäße tritt unmittelbar nach dem Beginn der Blutdrucksteigerung ein und verläuft parallel mit der letzteren.

Das Ephedrin ruft Zusammenziehung der Milz hervor, die ihr Höchstmaß erreicht und längere Zeit andauert, unabhängig von der Stelle der Einspritzung.

3. An eviscerierten Hunden, wie auch an solchen mit verkürztem Blutkreislauf, zeitigte Ephedrin dieselbe Wirkung auf den Blutdruck wie an den anderen Hunden.

4. Bei dem Herzen verursacht das Ephedrin, wenn es den Blutdruck erhöht, Förderung und Beschleunigung der Herztätigkeit. In den Fällen, in denen Absinken des Blutdruckes eintritt, wird die Herztätigkeit herabgesetzt. Die Veränderungen im Blutdruck stehen in vollkommenem Abhängigkeitsverhältnis zu denjenigen in der Herztätigkeit. Förderung der Herztätigkeit hat Blutdrucksteigerung, und Abnahme der Herztätigkeit hat Blutdrucksenkung zur Folge.

5. Die einzige Ursache für die Veränderung im Blutdruckniveau durch Ephedrin ist die in der Herztätigkeit eintretende Veränderung. Die Blutgefäße erleiden nur passive Veränderungen.

Literatur.

1) Meyer, H. H., u. R. Gottlieb: Die experim. Pharmakologie 1933, S. 433. Urban-Schwarzenberg. — 2) Chen, K. K., u. C. F. Schmidt: J. Pharmacol. (Am.) **24**, 339 (1924). — 3) Fujii, M.: J. orient. Med. (Mandsch.) **3**, 1 (1925). — 4) Chen, K. K., u. W. J. Meek: J. Pharmacol. (Am.) **28**, 31 (1926). — 5) Barlow, O. W., u. T. Sollmann: Ebenda **30**, 21 (1926). — 6) Marcu, J.: Bull. Soc. méd. Hôp. Bucarest Jahrg. 8, Nr. 8, S. 255 (1926). Referiert Ronas Berichte **40**, 308. — 7) Gradinescu, A., u. J. Marcu: C. r. Soc. Biol. **96**, 27 (1927). — 8) Marcu, J., u. P. Gheorghiu: Ebenda **96**, 1439 (1927). — 9) Marcu, J., u. P. Gheorghiu: Ebenda **96**, 1447 (1927). — 10) Reynolds, Chapman u. S. N. Blackberg: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **24**, 870 (1927). Referiert Ronas Berichte **43**, 315. — 11) Chen, K. K.: J. Pharmacol. (Am.) **33**, 219 (1928). — 12) Euler, U., u. G. Liljestrand: J. Physiol. (Brit.) **65**, 22 (1928). — 13) Wilson, Ch. P., C. Pilcher u. T. R. Harrison: Arch. int. Med. (Am.) **41**, 622 (1928). Referiert Ronas Berichte **47**, 841. — 14) Takács, L.: Wien. klin. Wschr. **1928**, S. 1375. — 15) Schaumann, O.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **138**, 208 (1928). — 16) Launoy, L., u. P. Nicolle: C. r. Soc. Biol. **99**, 1387 (1928). — 17) Coelho, E.: Ebenda **99**, 1525 (1928). — 18) Ding, M.: Z. exper. Med. **65**, 547 (1929). — 19) Liljestrand, S. H., u. C. F. Schmidt: J. Pharmacol. (Am.) **39**, 251 (1930). — 20) Hildebrandt, T., u. H. Mügge: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **157**, 90 (1930). — 21) Hildebrandt, T., u. H. Mügge: Klin. Wschr. **1931**, S. 291. — 22) Suzuki, Y.: Jap. J. med. Sci. Pharmacol. **5**, 67 (1931). — 23) Wada, M.: Jap. J. med. Sci. Biophysics **2**, 9 (1931). — 24) Hou, H. Ch.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **29**, 795 (1932). Referiert Ronas Berichte **68**, 594. — 25) Hou, H. Ch.: Chin. J. Physiol. **6**, 243 (1932). Referiert Ronas Berichte **70**, 797. — 26) Puccinelli, E.: Studi Sassaresi **11**, 543 (1933). Referiert Ronas Berichte **76**, 368. — 27) Pak, C., u. P. E. Read: Chin. J. Physiol. **7**, 199 (1933). Referiert Ronas Berichte **81**, 541. — 28) Rumfelder, H.: Erlangen Diss. 1933, S. 21. Referiert Ronas Berichte **82**, 525. — 29) De Agazio, A.: Atti Acad. naz. Lincei, VI, S. 19, 358 (1934). Referiert Ronas Berichte **80**, 159. — 30) Meek, W. J., u. M. H. Seevers: J. Pharmacol. (Am.) **51**, 287 (1934). — 31) Sturm, A., K. Gietz u. K. Kempte: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **183**, 363 (1936). — 32) Davis, J. E.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **36**, 71 (1937). — 33) Oremus, J.: Arch. internat. Pharmacodynam. **59**, 30 (1938). — 34) Hamet, Raymond: C. r. Soc. Biol. **121**, 746 (1936).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Zur Biologie des 2, 4-Diaminoazobenzols.

II. Mitteilung*:

Über die bakterizide Wirkung und einige andere Eigenschaften des Azorhodans.

Von

H. Riedel.

(Eingegangen am 10. Februar 1940.)

Lockemann und Ulrich (1) hatten bei der Untersuchung einiger Chrysoidinderivate feststellen können, daß diesen Verbindungen nicht unbeträchtliche bakterienabtötende Wirkungen zukommen. Die Prüfung des Azohels, das vom Hersteller** als Salzsäure-Citronensäureverbindung des 2, 4-Diaminoazobenzols bezeichnet wird, ergab, daß eine 0,1 %ige wässerige Lösung Typhusbazillen in wässeriger Aufschwemmung im Verlauf einer Stunde abtötete. Eine wässerig-alkoholische Azojod-Lösung, die aus der Jodwasserstoffverbindung des 2, 4-Diaminoazobenzols bestehen soll, verhinderte bereits in einer Konzentration von 0,01 % nach einstündiger Einwirkungsdauer das Wachstum wässerig aufgeschwemmter Colibakterien. Hierbei spielte natürlich der Alkoholgehalt eine gewisse Rolle, was in der genannten Arbeit auch entsprechend berücksichtigt wurde. Weiter hatten die obengenannten Autoren die keimtötende Wirkung von Azohel und Azojod auf Staphylococcus pyogenes aureus in einer bisher unveröffentlichten Arbeit geprüft und dabei eine beachtliche bakterizide Wirkung beobachten können.

Die in der vorliegenden und der ersten Mitteilung untersuchte Substanz wurde dem Pharmakologischen Institut im Jahre 1935 als Monorhodanid des 2, 4-Diaminoazobenzols zur Verfügung gestellt. Über ihre wichtigsten chemischen Eigenschaften wurden bereits früher einige Hinweise gegeben. Es wurde auch auf die Tatsache aufmerksam gemacht, daß der Schmelzpunkt, der durch Alkalien aus Azorhodan freigesetzten Base bei 159 bis 160° unkorr. lag, statt bei 117°, wie es für 2, 4-Diaminoazobenzol angegeben wird. Zur Verwendung gelangten hier eine wässerige 0,9 % NaCl enthaltende Lösung von Azorhodan in einer Konzentration 1 : 6000, außerdem eine wässerig-alkoholische Lösung 1 : 1000 in 25 %igem Äthylalkohol. Methodisch wurde so vorgegangen, daß von einer Bakterienreinkultur 2 Platinösen voll in 1 ccm der zu untersuchenden Lösung übertragen und

* I. Mitteilung vgl. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 190 (1940). — ** Dr. med. Hubold u. Bartsch, Grünheide i. d. Mark.

dann in bestimmten Zeitabständen 2 Ösen dieser Bakteriensuspension auf sterile Nährplatten überimpft wurden. Die Versuchstemperatur lag nicht unter 18° und nicht über 20°. Die beimpften Platten wurden anschließend 24 Std. im Brutschrank bei 37° gehalten. Für das Versuchsergebnis war die Tatsache maßgebend, ob die Bakterien nach dieser Zeit gewachsen waren oder nicht. Der Nachteil dieser Methode, der darin lag, daß beim Überimpfen der Bakterien aus den Desinfektionslösungen immer noch etwas bakterizider Stoff mit den Ösen auf die sterile Nährplatte gelangte und dort weiter wirken konnte, wurde in den folgenden Versuchen ruhig in Kauf genommen, da es sich herausgestellt hatte, daß die Bakterien im Anfangsstück eines Ausstriches, in dem die größte Menge des mitgeschleppten Desinfiziens hängenbleiben mußte, regelmäßig am stärksten gewachsen waren. Für die beschriebenen Versuche wird ein +-Zeichen für „gewachsen", ein —-Zeichen für „nicht gewachsen" verwendet. Die Ergebnisse der für jede Bakterienart mehrmals wiederholten Experimente sind tabellarisch wiedergegeben.

Wirkung des Azorhodans auf Staphylococcus pyogenes aureus.

Konzentration	Einwirkungszeit			
	1 Min.	5 Min.	25 Min.	125 Min.
1:6000 in 0,9%igem NaCl	+	+	+	+
1:1000 in 50 Teilen H_2O und 50 Teilen Glyzerin	+	+	+	+
1:1000 in 25%igem Alkohol	+	+	+	—

Die wässerige Lösung ist demnach in der Konzentration 1 : 6000 in der angegebenen Zeit unwirksam. Die Möglichkeit, höher konzentrierte Lösungen zur Anwendung zu bringen, scheiterte an der geringen Wasserlöslichkeit des Azorhodans, das mit 1 : 6000 bei 18° schon fast seinen Sättigungsgrad erreicht hat. Die Unwirksamkeit der Lösung 1 : 1000 in dem 50%igen Glyzerin-Wassergemisch erklärt sich wahrscheinlich aus der Bewegungshemmung der Azorhodanmoleküle durch das zugefügte Glyzerin. Die Lösung 1 : 1000 in 25%igem Alkohol hatte dagegen die Staphylokokken in 125 Minuten abgetötet. Es kann kaum angenommen werden, daß der Alkoholzusatz hierbei eine entscheidende Rolle spielte, da die Kontrollen, die einer 25%igen Alkohollösung ohne Azorhodanzusatz 125 Minuten lang ausgesetzt wurden, stark gewachsen waren.

Wirkung des Azorhodans auf Bacterium coli.

Konzentration	Einwirkungszeit			
	1 Min.	5 Min.	25 Min.	125 Min.
1:6000 in 0,9%igem NaCl	+	+	+	kaum gewachsen
1:1000 in 25%igem Alkohol	+	+		—

Die Frage, ob Azorhodan nach der Passage durch den menschlichen Organismus und Ausscheidung in den Harn imstande ist, Colibakterien in kürzerer Zeit abzutöten, wurde in folgendem Versuch geprüft.

Es wurden 100 mg Azorhodan in wässeriger Suspension eingenommen und die am stärksten gefärbte Harnportion in der oben beschriebenen Weise mit Colibakterien zusammengebracht. Es war jedoch selbst nach 625 Min. langer Einwirkung keine Desinfektionswirkung des tief rot gefärbten Harns zu beobachten. Der Färbung nach hätte der Harn etwa wie eine Azorhodanlösung 1 : 6000 wirken, also Colibakterien nach 625 Min. abtöten müssen. Ein einfaches Experiment gab die Erklärung für das Versagen der Desinfektionswirkung des Harns in vitro.

Versetzte man eine konzentrierte wässerige Azorhodanlösung mit einer ausreichenden Menge Alkali, so entstand sofort Trübung durch ausgefallene Farbbase. Schüttelte man dann die Suspension mit Äther, Chloroform, Petroläther oder irgendeinem anderen Lipoidlösungsmittel aus, ging die Base in dasselbe über, während sich die wässerige Phase vollkommen entfärbte. Wurde der gleiche Versuch mit nach Azorhodaneingabe ausgeschiedenem Harn angesetzt, färbte sich das angewendete Lösungsmittel gelb, d. h. aus einem in den Harn ausgeschiedenen Farbstoffsalz wurde durch den Alkalizusatz Farbbase freigesetzt. Durch diese alkalische Extraktion war aber der Farbstoffgehalt des Harns bei weitem nicht erschöpft. Der Harn zeigte noch sehr starke Indikatoreigenschaften. Er hatte bei alkalischer Reaktion orangegelbe Farbe, die nach Ansäuern mit Mineralsäuren in ein sattes Rubinrot überging. Demnach mußte der Harn noch ein anderes Ausscheidungsprodukt des Azorhodans enthalten. Den Beweis hierfür erbrachte die hydrolytische Spaltung der unbekannten Fraktion mit Salzsäure, die durch kurzes Aufkochen des angesäuerten Harns und sofort darauffolgende Abkühlung erreicht wurde. Schüttelte man nun den jetzt wieder alkalisierten Harn aus, so färbte sich das Lösungsmittel von neuem stark gelb. Daraus ergab sich die Schlußfolgerung: Azorhodan wird nach oraler Aufnahme in 2 verschiedenen Fraktionen in den Harn ausgeschieden, wobei die Möglichkeit besteht, daß es sich bei der ersten Fraktion vielleicht um noch unverändertes Azorhodan handelt, während die zweite wahrscheinlich aus einem veresterten Oxydationsprodukt des 2, 4-Diaminoazobenzols besteht. Wie es für den Fall des „Neotropins" von Junkmann (2) bereits genau untersucht wurde, ist für die Ausscheidungsprodukte des Azorhodans kaum noch bakterizide Wirkung anzunehmen, da die veresterte Fraktion die Hauptmenge der ausgeschiedenen farbigen Produkte ausmacht (3). Den Einfluß lebendiger entzündlich veränderter Oberflächenstrukturen der Blasenschleimhaut auf die Ausscheidungskörper des Azorhodans zu bestimmen, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, denn es wäre durchaus möglich, daß unter diesen Bedingungen aus an sich unwirksamen Stoffen wieder bakterizide Verbindungen entstehen könnten.

Das Ergebnis eines Desinfektionsversuches mit Pneumokokken, die auf Blutagarplatten überimpft wurden, ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Konzentration	Einwirkungszeit			
	1 Min.	5 Min.	25 Min.	125 Min.
1:6000 in 0,9%igem NaCl.....	+	+	+	−
1:1000 in 25%igem Alkohol.....	−	−	−	−

In diesem Versuch fiel die starke Desinfektionswirkung der alkoholischen Azorhodanlösung 1 : 1000 auf. Aus Kontrollversuchen ging allerdings hervor, daß eine 25%ige Alkohollösung allein Pneumokokken schon nach 5 Minuten abtötete, der Alkoholgehalt in diesem Falle also durchaus nicht gleichgültig war.

Unter den sonstigen Eigenschaften des Azorhodans ist besonders seine geringe Toxizität hervorzuheben. Schon Haack (4) hatte in seiner Arbeit darauf hingewiesen. Dosen von 0,125, 0,25, 0,5 und 1 mg/g wurden oral von Mäusen sehr gut vertragen. Ebensowenig beeinträchtigte die subcutane Applikation von 1 ccm in 0,9%igem NaCl gesättigter Azorhodanlösung das Allgemeinbefinden etwa 20 g schwerer Mäuse. Erst eine Riesendosis von 100 mg Azorhodan, in 1 ccm Gummi-arabicum-Lösung suspendiert, wirkte nach subcutaner Gabe im Verlauf von 12 Stunden tödlich. Ratten vertrugen orale Dosen bis zu 2 g/kg. Noch höhere Dosen wurden nicht verabreicht. Nach subcutaner Application von 1 g/kg in Suspension blieben alle so behandelten Ratten am Leben. Ein 3 kg schweres Kaninchen, dem 30 Tage lang je 200 mg Azorhodan mit der Schlundsonde verabreicht worden waren, zeigte normale Gewichtszunahme und wies keine Anzeichen von Schädigung auf. Auch Katzen vertrugen Dosen von 0,1 g/kg sehr gut. Im Blutdruckversuch wurde bei Katzen in Chloralosenarkose nach venöser Zufuhr von konzentrierter in 0,9%igem NaCl bereiteter Azorhodanlösung keine Änderung des Druckniveaus der Carotis beobachtet. Die applizierten Mengen bewegten sich im Bereich von 1—10 ccm.

Die Frage nach dem Schicksal des Azorhodans im tierischen Organismus wurde zunächst in einigen wenigen Versuchen behandelt, in denen weißen Mäusen eine bestimmte Dosis des Farbstoffs oral eingegeben und die Tiere dann in verschiedenen Zeitabständen nach der Applikation getötet und seziert wurden. Von 20 durchschnittlich 20 g schweren Mäusen, die 0,5 mg/g Azorhodan in Suspension mit der Schlundsonde bekamen, wurden je 4 Tiere 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 20 Stunden nach der Applikation getötet. Die Sektionsergebnisse seien kurz mitgeteilt.

Nach 30 Minuten: Bindegewebe und Fett stark gelb. Dünndarm rot, gegen den Dickdarm hin gelblich gefärbt. Dickdarm selbst ungefärbt Gallenblaseninhalt orangefarben. Im methylalkoholischen Leber- und Nierenextrakt roter Farbstoff. Im Lungen- und Milzextrakt nichts.

Nach 1 Stunde: Bindegewebe und Fett stark gelb. Dünndarm orangefarben, zum Dickdarm hin abblassend. Dickdarm selbst kaum gefärbt. Gallenblaseninhalt stark orangefarben. Leber- und Nierenextrakt farbstoffreich. In Lungen und Milz wenig.

Nach 2 und 4 Stunden: Befund wie nach 1 Stunde.

Nach 20 Stunden: Hier war bei der Sektion in den Organen keine Färbung mehr zu entdecken. Auch in den Extrakten von Leber und Niere war nichts zu finden.

Auffällig war bei diesen Versuchen die Tatsache, daß im Dickdarm selbst in verschiedenen Zeitabständen nach der Gabe so gut wie kein Farbstoff zu finden war. Die Vermutung, daß das Azorhodan vielleicht durch Bakterieneinwirkung zerstört wird, konnte durch einen einfachen Versuch bestätigt werden. Aus dem Dickdarm einer frisch getöteten Ratte wurde ein Kotballen von der Größe eines Dattelkernes in etwas physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit 100 ccm in 0,9% NaCl gesättigter Farbstofflösung vermischt und im Brutschrank bei 38° gehalten. Alle 24 Stunden wurden 5 ccm entnommen, mit ein paar Tropfen Kalilauge versetzt, die Base mit Chloroform ausgeschüttelt und mit einer ebenso behandelten, der Bakterieneinwirkung nicht ausgesetzten Stammlösung verglichen. Nach 24 Stunden war die ursprüngliche Konzentration schon um mehr als die Hälfte vermindert. Nach 4 Tagen war aus der alkalisierten Lösung praktisch keine Base mehr auszuschütteln, der Farbstoff also zerstört.

Bei dem Versuch, in methylalkoholischen Extrakten der Leber, Nieren, Lungen und Milz auf kolorimetrischem Wege die absoluten Mengen Farbstoff zu ermitteln, die sich in verschiedenen Zeitabständen nach der Applikation in den Organen gespeichert hatten, zeigte sich folgendes Ergebnis.

Dosis 0,5 mg/g Maus per os.

Organ	Nach 30 Min. mg	Nach 1 Std. mg	Nach 2 Std. mg	Nach 4 Std. mg	Nach 20 Std. mg
Leber	0,050	0,060	0,200	0,010	nichts
Nieren	0,020	0,120	0,200	0,004	„
Lungen	nichts	0,010	0,030	nichts	„
Milz	„	0,004	0,025	„	„

Die Werte beziehen sich jeweils auf das ganze Organ. Vorausgesetzt ist hier die Identität des gespeicherten Farbstoffs mit dem applizierten Azorhodan. Nach den früher beschriebenen Eigenschaften des Azorhodans ist diese Annahme sehr willkürlich, und die angeführten Zahlen können nur ein paar Anhaltspunkte für den Verbleib des Farbstoffs geben. Jedenfalls war nach 2 Stunden in den beschriebenen Organen ein gewisses Maximum an Färbung eingetreten. Der Gallenblaseninhalt hatte sich bei Mäusen bereits 30 Minuten nach der Applikation stark rot gefärbt. In der gleichen

Zeit war im Harn Farbstoff nachzuweisen. Dieser Befund ließ sich an Kaninchen und Katzen bestätigen. Beim Menschen erfolgte die erste Ausscheidung gefärbten Harns 30—60 Minuten nach der Aufnahme von 50—100 mg wässerig suspendierten Azorhodans. Demnach werden das Azorhodan oder besser seine Umwandlungsprodukte — wahrscheinlich erfolgt schon in der Darmwand Abspaltung der Rhodanwasserstoffsäure — leicht resorbiert und gelangen rasch in den allgemeinen Körperkreislauf. Bereits vom Magen aus wird gefärbte Substanz resorbiert, denn bei Katzen konnte in Urethannarkose nach Anlage einer Ligatur in der Pylorusgegend orangefarbene Flüssigkeit in den Gallenwegen spätestens 1 Stunde nach oraler Applikation von Azorhodan nachgewiesen werden.

Wurde Azorhodan Ratten, Kaninchen oder Katzen subcutan verabreicht, so fand sich bei Verwendung einer Kristallsuspension immer das gleiche Bild. Im Zentrum des Stichkanals lag unverändertes Azorhodan, während in der Peripherie die Azorhodankriställchen mit einer gelben Schicht, die wahrscheinlich aus Farbbase bestand, überzogen waren. In dem direkt anliegenden Fettgewebe der Unterhaut hatten sich die Fettzellen homogen gelb gefärbt. Nach der Applikation von 50 mg Farbstoff waren nach 4—5 Tagen noch Reste vorhanden.

Die Wundheilung wurde durch Azorhodan weder im negativen noch im positiven Sinne beeinflußt. Schnittwunden, die auf der Rückenhaut von Ratten, Kaninchen und Katzen angelegt und stark mit Azorhodanpulver eingestäubt worden waren, heilten in der gleichen Zeit ab wie Schnitte, die in gleicher Weise an korrespondierenden Stellen angelegt, aber nicht mit Azorhodan behandelt worden waren. Entzündliche Veränderungen konnten nicht festgestellt werden.

Unter den oben geschilderten Befunden verdient die geringe Giftigkeit des Azorhodans besonders hervorgehoben zu werden. Im Selbstversuch und Untersuchungen an zahlreichen anderen Personen wurden des öfteren Dosen von 100 mg Farbstoff oral zugeführt, ohne daß die geringsten krankhaften Symptome bemerkt worden wären. Hierher gehört auch die Tatsache, daß subcutan und direkt in Schnittwunden eingebrachtes Azorhodan niemals Entzündungserscheinungen hervorrief, was weiter oben bereits angedeutet wurde. Ob es möglich sein wird, Azorhodan in Pulverform, in wässeriger oder alkoholischer Lösung als Wunddesinfizienz oder Ersatz für einen Jodanstrich anzuwenden, wird die klinische Erfahrung entscheiden müssen. Es ist wenig wahrscheinlich, daß man mit wässerigen Azorhodanlösungen bei Staphylokokkeninfektionen der äußeren Haut viel erreichen wird. Die Löslichkeit des Azorhodans und damit die bakterizide Wirkung ist in Wasser zu gering. Es ist auch nicht möglich, einfach Leitungswasser als Lösungsmittel zu verwenden, weil die an verschiedenen Orten verschieden starke „Härte“ immer mehr oder weniger starke Trübung der Farbstofflösung hervorrufen wird, die allenfalls durch Säurezusatz verhindert werden kann. In Alkohol und Wasser-Alkoholgemischen ist Azorhodan dagegen

viel leichter löslich. Die Anwendung in alkoholischer Lösung hat den Vorteil, daß der Alkohol wie beim Jodanstrich rasch verdunstet und das Desinfiziens in konzentriertester Form auf der Haut zurückläßt. Bei der Ausscheidung in den Harn verhält sich Azorhodan wie Pyridium (5) und Neotropin. Es wird wie diese bei der Passage durch den tierischen Organismus verändert und erscheint in abgewandelter Form in der Harnflüssigkeit.

Zusammenfassung.

Es wurde die bakterizide Wirkung von wässerigen und wässerig-alkoholischen Azorhodanlösungen gegen Staphylokokken, Pneumokokken und Colibakterien geprüft. Außerdem wurden einige toxikologische Daten mitgeteilt und das Verhalten des Azorhodans bei der Ausscheidung in den Harn untersucht.

Literatur.

1) Lockemann, G., u. W. Ulrich: Dtsch. med. Wschr. **1934**, S. 395. — 2) Junkmann, K.: Z. exper. Med. **99**, 300 (1936). — 3) Riedel, H.: Versuche über die Ausscheidung einiger Azokörper. Dissertation (Berlin) 1937. — 4) Haack, H. J.: Pharmakologische Untersuchungen über Azorhodan. Dissertation (Halle) 1939. — 5) Adair, F. L. u. a.: J. Ur. (Am.) **40**, 319 (1938); zitiert nach Ronas Berichten **109**, 671 (1939).

Nachtrag zu der Arbeit

H. G. Rietschel:

Zur Frage der Tachyphylaxie, Bd. 193, S. 454ff. (1939).

Der Autor, der im Felde steht und die Korrektur nicht selbst besorgen konnte, wünscht nachträglich folgende Änderungen in seiner Arbeit:

1. S. 454 in der Anmerkung soll der vorletzte Satz: „Die Bezeichnung Tachyphylaxie usw." bis zum Schluß wegbleiben.

2. Auf S. 458 fehlt am Schluß des 1. Absatzes der Hinweis: siehe Abb. 1.

3. Die Abb. 1 und 2 sind zu vertauschen.

Aus dem Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie der Universität Breslau. (Direktor: Prof. Dr. O. Eichler.)

Versuche zur Auswertung von Mitteln zur Bekämpfung des Reizhustens.

Von

Oskar Eichler und Arnold Smiatek.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Dezember 1939.)

Als wir unsere Versuche begannen, existierten Methoden zur Auswertung von Hustenmitteln noch nicht. In der Zwischenzeit wurde eine solche Methode an Katzen ausgearbeitet[1], bei der durch Injektion von Jod eine chronische Pleuritis gesetzt wurde, die dann bei Reiz zum Husten führte.

Wir sind auf ganz andere Weise vorgegangen, indem wir versuchten, den Husten durch Anwendung reizender Gase oder Nebel hervorzurufen. Wir kamen sofort darauf, ausschließlich mit Meerschweinchen zu arbeiten, da sie außerdem leicht zu behandeln sind (z. B. sie beißen nicht). Es gibt nun zahlreiche Substanzen, die eingeatmet zum Hustenreflex Anlaß geben können, z. B. Ammoniak, Schwefeldioxyd, Amylacetat usw. Diese Gase führen aber zu Reflexen von der Nase aus und stören den ganzen Versuch. Man kann solche Reflexe verhindern, wenn man dafür geeignete Nebel einatmen läßt. Wir wählten dazu Schwefelsäurenebel. Mit unserem Entschluß begannen aber erst die Schwierigkeiten. Denn erst über zahlreiche Irrwege (die sich fast 2 Jahre hinzogen) gelang es uns, eine geeignete Technik auszubauen. Wir wollen diese Irrwege kurz schildern, weil sie andere vor Ähnlichem bewahren könnten.

1. Irrweg. Wir dachten daran, innerhalb einer Gaskammer Schwefelsäure zu verdampfen und sie so den Tieren zuzuführen. Uns gelang zwar, die Tiere zum Husten zu bringen, aber durch die notwendige Hitze beim Verdampfen erwärmte sich die Luft ungebührlich. Der Versuch der Durchmischung mittels eines Propellers führte zur Ausschleuderung der Nebelteilchen an den Wänden und zur Koagulation innerhalb des Gasraumes infolge auftretender Wirbel. Durch die Ausatmungsluft entstand soviel Wasserdampf, daß die Nebelteilchen gröber wurden. Die in ihnen enthaltene Schwefelsäure wurde sodann in der Konzentration dünner, so daß es uns nicht mehr gelang, auch bei vorhandenem Nebel den Husten zu erhalten.

[1] Ernst, A. M.: Arch. internat. Pharmacodynam. **58**, 363 (1938); **61**, 73 (1939).

2. Irrweg. Nach den bisherigen Erfahrungen war es uns klar geworden, daß eine exakte Vernebelung nur im strömenden Gas möglich war. Wir setzten dazu die Tiere in einen kleinen Käfig von 2 Liter Inhalt. Wenn wir 2 Liter Gas in der Minute durchströmen ließen und die Schnauze des Tieres nach der Einstromrichtung zu zeigte, schien uns diese Bedingung gewährleistet. Die Hustenstöße wurden beobachtet durch die vordere Fensterscheibe und mit einem Taster auf eine Rußtrommel übertragen. Wir machten jetzt den weiteren Versuch, die Hustenstöße zu registrieren. Das Tier wurde dafür im Innern der Gaskammer fixiert und auf eine

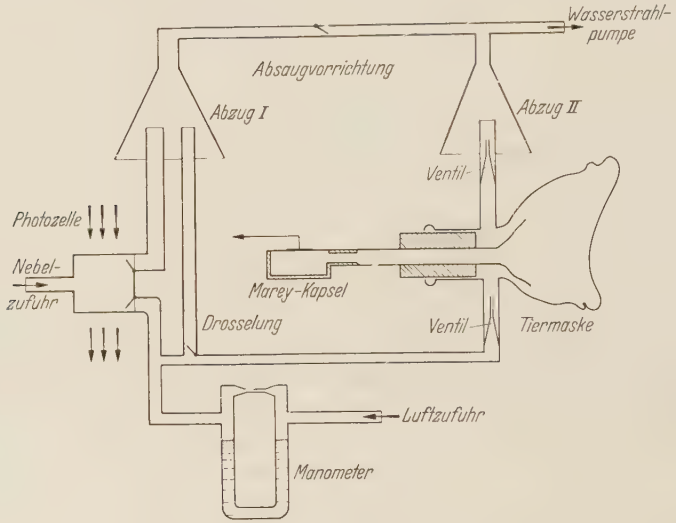


Abb. 1. Schema der Versuchsanordnung.

Anordnung gesetzt, wie sie den bekannten Zitterkäfigen entspricht. Durch diese Zitterkäfige sollten die Bewegungen des Tieres aufgeschrieben werden. Zur Registrierung der Hustenstöße wurde eine Gummiblase um den Körper des Tieres gelegt. Die Hoffnung, Bewegung und Hustenstöße voneinander zu unterscheiden, erfüllte sich leider nicht; denn Bewegungen wurden durch beide Registrieranordnungen übertragen, und zwar stärker als der Husten. Außerdem wurden die Tiere unruhig und versuchten aus der Gummiblase herauszukommen.

Definitive Methode. Wir ordneten die Verhältnisse jetzt so an, daß wir den Tieren das mit Nebeln beladene Gas in einer Art Gasmaske zuführten. Auf der Abb. 1 sehen wir schematisch die Anordnung. Der Nebel wird am besten aus einer n/2 Schwefelsäure entwickelt. Dabei ist die Konzentration in den Nebelteilchen 60% H_2SO_4. Die Anwesenheit dieser Konzentration ist unbedingt notwendig. $^1/_4$ molare Konzentrationen lassen keinen Husten mehr aufkommen. Darauf muß man den größten

Wert legen. Um diese Konzentration zu unterhalten, ist das strömende Gas notwendig (siehe Irrweg 1). Das Gas strömt im ganz langsamen Strom durch den Raum der Gasmaske. Damit der Strom nicht zu stark wurde, wodurch die Registrierung unmöglich wird, wurde die überschüssige Menge kurz vorher durch eine regulierbare Schraubklemme abgeleitet. Das Tier atmet also, ohne einen zu großen Widerstand der Ventile überwinden zu müssen, aus dem langsamen Strom heraus. Durch das Vorschalten eines kleinen Trichters vor die Nase wurde die Atmung und darauf die Hustenstöße mittels einer Marey-Kapsel registriert. In langwierigen Versuchen haben wir die erhaltenen Ausschläge, die wir auf einigen Kurven abbilden, kontrolliert, ob es sich hier um Bewegungen handelt, indem wir durch Auskalkulation und kontrollierbare Beobachtung besonders der Bauchmuskulatur (das Tier sitzt in einem Drahtkäfig) den Husten feststellten. Außerdem wurden Bewegungen auch mittels einer Art Zitter-

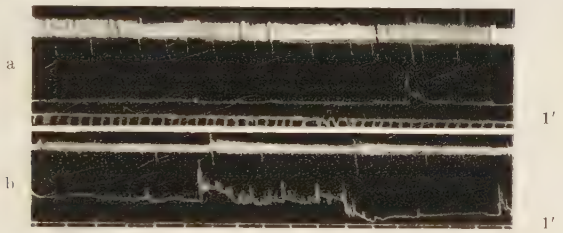


Abb. 2. a) 2 Tage nach Salzsäurenebel $ct = 6000$. Bewegungen werden auf der Mittelkurve nicht registriert, während zahlreiche Hustenstöße vorhanden sind. b) Nach Schwefelsäurenebel $ct = 2200$ nach 2 Tagen. Die Bewegungen in der Mitte der Kurve sind außerordentlich zahlreich, führen aber nicht zur Registrierung von Hustenstößen. Es sieht so aus, als ob ein besonders starker Hustenstoß die Bewegungen induzierte.

käfig übertragen. Diese Kontrollen bilden wir auf einigen Kurven ab (siehe auch Kurve 4e). Sehr heftige Bewegungen können auch an der Atem-Hustenkurve bemerkbar werden. Doch sind diese vom Husten dadurch zu unterscheiden, daß die Schwankungen hintereinander weg geschehen und so ein anscheinend breites Band von Husten anzeigen. Es gibt nun auch, besonders bei Vernebelung mit hohen Konzentrationen, regelrechte Hustenparoxysmen. Diese Paroxysmen kann man aber nicht von Bewegungen unterscheiden, zumal bei solchen Anfällen die Tiere an sich auch ganz unruhig werden. Solche Ereignisse sind aber bei der eigentlichen Auswertung nicht zu fürchten.

Unsere erste Hoffnung war — und das könnte man als einen weiteren Irrweg bezeichnen — während der Nebelzuleitung selbst den entstandenen Husten durch irgendein Hustenmittel zu unterdrücken bzw. die Entwicklung eines Hustens bei einer bestimmten Konzentration zu verhindern. Tatsächlich verlaufen aber die Ereignisse so, daß bei Beginn der Nebelzuleitung eine gewisse Inkubationszeit notwendig ist, bis die ersten Hustenstöße erscheinen. Bei fortgesetzter Gabe kommt es allmählich zu

einer derartigen Steigerung der Hustenstöße, daß eine Auswertung unmöglich ist, zumal die Tiere immer unruhiger werden. Der Beginn dieser Hustenstöße war um so früher, je höher die eingeatmete Konzentration war. Wir sind dazu gekommen, schließlich die Hustenreizwirkung bei einer Konzentration von 10 γ Schwefelsäure im Liter nachzuweisen, d. h. etwa bei derselben Konzentration, die Flury und Zernik als Grenzkonzentration beim Menschen angeben. Niedere Konzentrationen wurden von uns nicht angewandt, weil unsere Meßgeräte nicht ausreichten. Die Verdünnung eines Gases stellten wir so her, daß zu einem Nebel von bestimmter Dispersität, die wir mit der Photozelle kontrollierten (s. Abb. 1), frische getrocknete Luft zuführten.

Bei dieser Gelegenheit hatten wir auch Versuche angestellt, ob man statt Schwefelsäure auch Salzsäure für unsere Zwecke gebrauchen kann.

Abb. 3. HCl-Nebel $ct = 6000\,128\ \gamma$/Liter. Am Pfeil Beginn der Zufuhr. Atmung sistiert und kommt erst allmählich in Gang. Nach etwa 7 Minuten Einatmung der erste Hustenstoß.

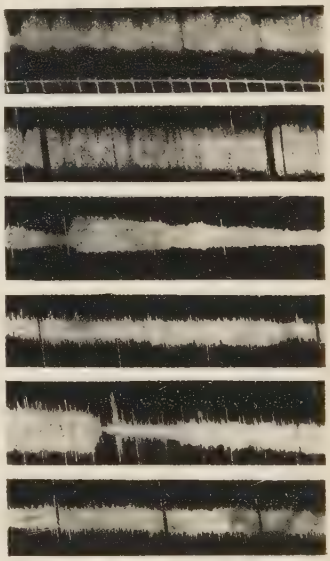


Abb. 4. Schwefelsäurenebel $ct = 2200\ \ 90\ \gamma$/Liter. a) Atmung vor der Einatmung mit manchmal vorkommenden Schwankungen der Atmungstiefe. b) Atmung während der Vernebelung, einzelne Hustenstöße. c) Nach 6 Stunden. d) Nach 2 Tagen, die Zahl der Hustenstöße ist vermehrt. Auf der Kurve befinden sich vier Stöße. e) Nach 8 Tagen, Zahl der Hustenstöße noch gesteigert. In der Mitte der Kurve Bewegungen. f) Nach 20 Tagen nur noch ein Hustenstoß auf der Kurve.

Wir sehen einen Versuch auf Abb. 3. Da die Spannung der Salzsäure im Salzsäurenebel aber nicht vernachlässigt werden kann, erhielten wir beim Beginn der Zuleitung von der Nase aus Reflexe, wobei die Atmung teils aufhörte, teils ganz klein fortgeführt wurde (s. Abb. 3). Wir sehen auf der Abbildung, daß späterhin Hustenstöße erscheinen. Aber da vorher schon die oberen Atemwege beschädigt wurden (wodurch Eiterungen in der Nase entstehen können und auch entstanden sind), sind wir davon abgekommen. Wir verwenden jetzt ausschließlich Schwefelsäurenebel. Die Entwicklung der Folgen ihrer Einatmung geben wir auf Abb. 4 wieder. Es zeigt sich nun, daß der Husten schon während der Einatmung der Nebel beginnt, daß aber der Höhepunkt bei den Grenzkonzentrationen

häufig erst in einigen Tagen erreicht wird. Auf der Abteilung b der Abb. 4 sehen wir, daß während der Einatmung gelegentlich Hustenstöße vorhanden sind. Nach 6 Stunden ist die Zahl kaum vermehrt; erst nach 2 und 8 Tagen findet sich das Maximum. Selbst nach 20 Tagen sind immer noch Hustenstöße merkbar. Wir sind so vorgegangen, daß wir die Tiere immer eine halbe Stunde zu verschiedenen Zeiten kontrollierten und zur Abschätzung der Stärke des Hustens haben wir die Hustenstöße in dieser halben Stunde ausgezählt. Zur Auszählung benötigt man eine gewisse Erfahrung, damit man sich nicht von unruhiger Atmung täuschen läßt. Bei glücklichen Strömungs- und Widerstandsverhältnissen im System kann man sogar erreichen, daß die Atmung fast ganz von der Kurve verschwindet. Die Schwierigkeiten machen die Ventile.

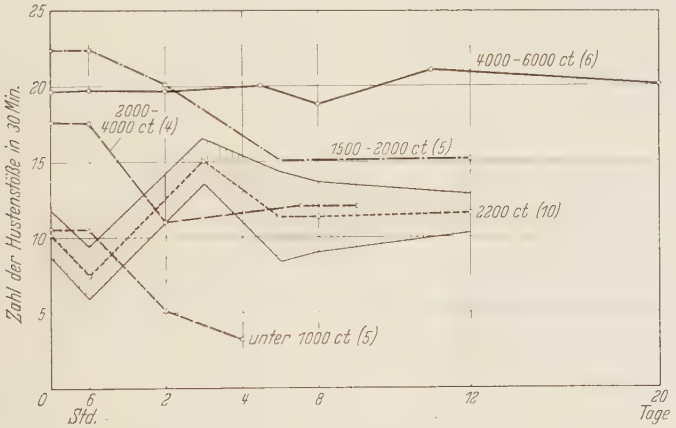


Abb. 5. Entwicklung des Hustens bei Beobachtung bis zum 20. Tage. An jeder Kurve ist das ct-Produkt angegeben. In Klammern die Zahl der Tiere in der Gruppe. Um die Kurve $ct = 2200$ ein schraffierter Bereich, der die Streuung des Mittelwertes angibt. Ordinate: Zahl der Hustenstöße in $^1/_2$ Stunde.

Zur Abschätzung der Menge des Nebels, die wir zuführten, berechneten wir nach Zeit und Konzentration das Produkt $c \cdot t$, wie es bei Gaskampfstoffuntersuchungen üblich ist. In den meisten Fällen verwandten wir die Konzentration von 40 und 90 γ/Liter. Es war notwendig, mehrere Tiere in einer Gruppe zu erfassen und sie geschlossen zu behandeln, damit die Streuung ausgeschaltet wurde. Wir nehmen immer 4—6 Tiere in eine Gruppe, haben aber bei kleineren Ausschlägen, wie die späteren Kurven zeigen werden, noch größere Mengen anzusetzen für notwendig gefunden. Die Entwicklung des Hustens über die verschiedenen Zeiten gibt Abb. 5 wieder, auf dem wir die Konzentration nicht angeben, sondern nur das $c \cdot t$-Produkt. Wir sehen auf der einen Kurve $c \cdot t = 2200$, bei der wir die größte Zahl von Tieren hatten, die Streuung des Mittelwertes eingetragen. Gerade hier wird deutlich, wie sich der Husten im Laufe der ersten Tage

erst entwickelt. Während dieser Zeit soll man keine Auswertung vornehmen. Bei $c \cdot t$-Produkten unter 1000 klingt der Husten verhältnismäßig rasch ab.

Bei diesem niedrigsten Produkt wurde aber außerdem noch die geringste Konzentration angewandt. Es ist aus der Kurve zu ersehen, daß die Zahl der Hustenstöße etwa dem ct-Produkt nicht proportional ist. Wir haben uns darüber Gedanken gemacht, ob die Jahreszeit eine Bedeutung haben könnte, sind aber trotz unseres großen Materials von jetzt fast 200 Tieren nicht zu einem eindeutigen Ergebnis gekommen. Es hat

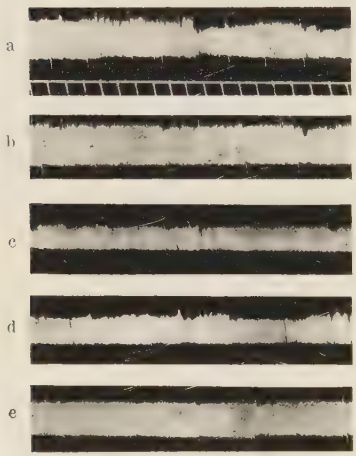


Abb. 6. a) Husten vor Gabe von Morphin. b) Beobachtung nach 1 Stunde; der Husten hat noch nicht abgenommen, dagegen auf Kurve c deutliche Abnahme nach 4 Stunden und besonders nach 1 Tag (Kurve d). e) Nach einem weiteren Tag ist der Husten wiedergekehrt.

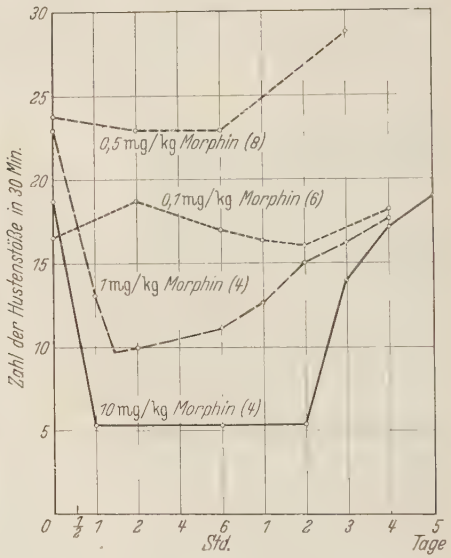


Abb. 7. Zusammenfassung der Morphinversuche. Im Durchschnitt sieht man die Verminderung der Hustenstöße nach Gabe von 1 mg Morphin. Geringere Dosierungen zeigen keine Wirkung. Ordinate: Zahl der Hustenstöße in 30 Minuten.

den Anschein, daß die Tiere im Winter empfindlicher sind. Wir sind auch bisher nicht zu einer histologischen Untersuchung der Receptorenfelder des Reizhustens gekommen, wollen es aber nachholen. Untersuchungen über die Absorption von Nebeln und Gasen in den Atemwegen werden später publiziert.

An dieser Stelle wollen wir nur darauf hinweisen, daß die Gleichmäßigkeit, mit der sich das Symptom des Reizhustens entwickelt, zur Auswertung von Hustenmitteln geeignet ist. Als Vorbedingung müssen wir allerdings auf die Notwendigkeit eines größeren Tiermaterials hinweisen, wegen der notwendig vorhandenen Streuung. Wir werden als Kriterium außerdem fordern müssen, daß ein Kurvenpunkt (in dem Verlauf) durch den zeitlich benachbarten bestätigt wird.

Als Beispiele wollen wir hier noch einige solche Versuche anschließen, um späteren Versuchen die Untersuchung der genaueren quantitativen Verhältnisse (insbesondere Morphin-Codein) zu überlassen.

An erster Stelle steht natürlich das Morphin. Auf Abb. 6 geben wir eine Originalkurve wieder mit teilweise nicht ganz typischem Verlauf. Die Hustenstöße sind nach der Vernebelung (a) auch nach 1 Stunde (b) noch nicht verschwunden. Das Maximum der Wirkung sehen wir nach 20 Stunden, während am Tage darauf der ursprüngliche Zustand hergestellt ist. Es wird also die volle Rückkehr erreicht.

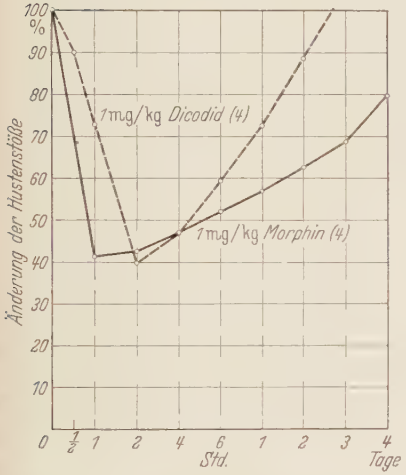


Abb. 8. Vergleich zwischen 1 mg Dicodid und Morphin. Änderung der Hustenstöße in Prozenten.

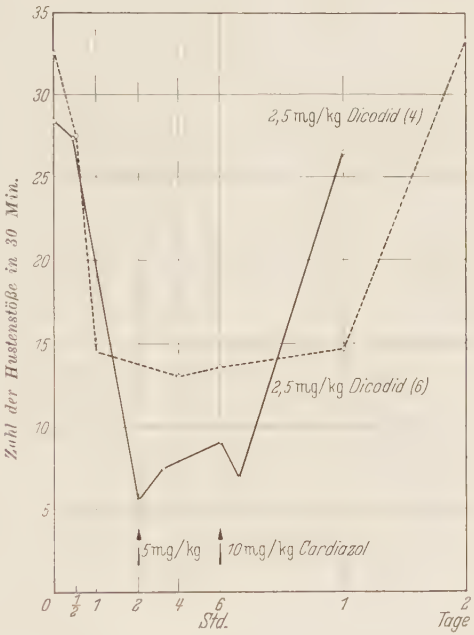


Abb. 9. Wirkung von 2,5 mg/kg Dicodid. Die Wirkung ist noch am nächsten Tage nachweisbar. Die beiden Kurven wurden hintereinander an denselben Tieren (bis auf zwei) vorgenommen. Zwei verschiedene Dosierungen. Cardiazol hatte keinen Einfluß auf den Husten, obwohl die Atmung erregt wurde. Also Trennung der Beeinflussung von Husten und Atemzentrum.

Auf Abb. 7 geben wir eine Zusammenfassung aller unserer Morphinversuche. Nach den Durchschnittskurven werden wir der Dosierung von 0,5 mg/kg Morphin keine Wirkung mehr zubilligen können. Das gilt aber nur für den Durchschnitt, wenn wir aber die einzelnen Tiere betrachten, wurden gelegentlich schon nach dieser, einmal aber schon nach 0,1 mg/kg Wirkungen gesehen. Durch solche gelegentlichen Empfindlichkeiten (oder sind es Zufälle) kann man bei der Auswertung an Einzeltieren getäuscht werden.

Auffällig an den Kurven ist die lange Dauer der Wirkung, besonders bei der Dosierung von 10 mg/kg. Darin scheint sich die Wirkung höherer Dosierungen noch mehr auszuprägen als in der absoluten Tiefe.

Wenn 2 Morphinderivate verglichen werden, wird man nicht die absolute Zahl der Hustenstöße als Ausgangspunkt nehmen, sondern die Zahl vor Gabe der Substanz = 100 % setzen, wie wir es beim Vergleich von Dicodid mit Morphin auf Abb. 8 getan haben. Auf dieser Kurve sehen wir, daß 1 mg Dicodid etwa dieselbe Wirkung hat wie 1 mg Morphin, abgesehen von der Länge der Wirkung. Diese Gleichwertigkeit ist anscheinend nur für diese Dosierung gültig. Weitere Versuche sind notwendig. Auf Abb. 9. sehen wir die Wirkung von 2,5 mg kg Dicodid, und zwar wurden hintereinander dieselben Tiere mit derselben Dosis behandelt. Die zweite Dosis wirkt anscheinend etwas stärker als die erste, aber nur in der Tiefe, nicht in der Dauer. Doch wollen wir das hier übergehen und nur auf eine weitere Behandlung in der zweiten Kurve hinweisen. Hier wurde Cardiazol als Erregungsmittel für die Atmung gegeben, um zu sehen, ob dadurch die das Hustenzentrum dämpfende Wirkung des Dicodids irgendwie vermindert oder aufgehoben wird. Das ist offenbar nicht der Fall. Da man dem Cardiazol eine allgemeine, erregende Wirkung auf die Medulla zubilligt, würde unser Befund bedeuten, daß Husten- und Atemzentrum nach durchaus verschiedenen Methoden erregt werden, bzw. daß die dem Dicodid antagonistische Wirkung auf das Atemzentrum sich nicht auf das Hustenzentrum erstreckt.

Darauf, daß das Hustenzentrum auch gegenüber Morphin anscheinend empfindlicher ist als das Atemzentrum, scheint das Bild mit der langen Wirkung des Morphins hinzuweisen. Wir haben zwar die Beeinflussung der Atmung nicht verfolgt, aber aus der Literatur sind uns keine derart langanhaltende Wirkungen bekanntgeworden.

Hier muß man nur eine Einschränkung machen. Es ist bekannt, daß beim Menschen durch vieles Husten ein vorhandener Reiz verstärkt oder unterhalten werden kann. Wenn man in solcher Situation etwa Codein gibt, kann man erreichen, daß der lokale Prozeß durch Ruhigstellung beseitigt wird. Die symptomatische wäre also eine ätiologische Behandlung geworden. Derartiges ist auch hier nicht von der Hand zu weisen. Doch ist es bemerkenswert, daß nach einigen Tagen doch die Rückkehr zum vorherigen Zustand erfolgt. Hier liegen noch zahlreiche ungeklärte Fragen.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Auswertung von Mitteln, die auf das Hustenzentrum wirken, beschrieben. Die Methode beruht auf der Erregung von Reizhusten durch Schwefelsäurenebel bei Meerschweinchen.

Mit Hilfe dieser Methodik wird die Wirkung verschiedener Gaben von Morphin und Dicodid verfolgt und nachgewiesen, daß Cardiazol und Dicodid sich antagonistisch wohl gegenüber dem Atemzentrum, nicht aber gegenüber der hustenstillenden Wirkung verhalten.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

Über die Beziehungen des Kohlehydratstoffwechsels zur Physiologie und Pharmakologie der Herzenergetik.

Von

Hans Gremels.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Februar 1940.)

Auf die Anregungen E. H. Starlings hin haben wir uns mit der Untersuchung [1] herzenergetischer Fragen beschäftigt. Bei deren weiterem Ausbau [2] konnten wir den Einfluß des vegetativen Nervensystems durch geeignete Anwendung der Überträgerstoffe der Nervenwirkung analysieren, wobei uns zum ersten Male der einwandfreie Nachweis der assimilatorischen Vaguswirkung, wie sie in einer Einschränkung der Verbrennungsvorgänge sichtbar wird, gelang.

Die von uns aufgefundene Wirkung der Digitalisglykoside [1] auf den Herzstoffwechsel in Form einer Herabsetzung des pathologisch erhöhten Sauerstoffverbrauchs haben wir bei einer Erweiterung [3] der Analyse auf eine Steigerung der Vaguserregbarkeit zurückführen können, deren tieferen Grund man in einer Änderung der Potentialbedingungen für den Vagusüberträgerstoff Azetylcholin suchen muß.

Nach der Klärung der nervösen Stoffwechselregulationen und ihrer pharmakologischen Beeinflussung am Sauerstoffverbrauch war der nächste Schritt die Einbeziehung des Kohlehydratstoffwechsels, das ja den Hauptlieferanten des Herzmuskels darstellt, in unsere Untersuchungen.

Auch auf diesem Gebiet hat E. H. Starling mit seinen Schülern die Grundlagen geschaffen. So finden wir in einer Arbeit von F. P. Knowlton und E. H. Starling [4] die ersten Untersuchungen des Zuckerverbrauchs am H. L. P., die ihre Fortsetzung in den Arbeiten von E. H. Starling und C. L. Evans [5] und C. L. Evans [6] fanden. Noch die letzte Arbeit des großen Physiologen hatte den gleichen Gegenstand zum Inhalt, wie aus den von L. E. Bayliss, E. A. Müller und E. H. Starling [7] gemachten Untersuchungen hervorgeht.

Methodik.

Sie ist dieselbe wie in unseren früheren Untersuchungen [1,2,3]. Mit den von Rühl [8] und Gollwitzer-Meier [9] erhobenen Einwänden gegen unsere Methode wollen wir uns jetzt etwas eingehender beschäftigen.

[1] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **169**, 689 (1933). [2] Ebenda **182**, 1 (1936). [3] Ebenda **186**, 625 (1937). — [4] J. Physiol. (Brit.) **45**, 146 (1912). — [5] Ebenda **49**, 67 (1914). [6] Ebenda **47**, 407 (1914). [7] Ebenda **65**, 33 (1928). [8] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 109 (1939). — [9] Pflügers Arch. **240**, 90 (1937).

Der Einwand, daß die gleichzeitige Messung des Lungenstoffwechsels beim H.L.P. unsere Sauerstoffverbrauchswerte unsicher mache, ist in dieser Form nicht richtig. Der Lungensauerstoffverbrauch ist an sich gering und konstant, so daß sein Anteil am Herzstoffwechsel die Sauerstoffwerte nur wenig beeinträchtigt. Die in der Literatur angegebenen Zahlen, die sich in der Hauptsache auf eine Arbeit von Starling und Evans [10] beziehen, sind nach unseren Erfahrungen viel zu hoch, denn sie würden etwa 10% des Grundumsatzes vom Ganztier ausmachen. Dies ist natürlich undenkbar, da ja sogar das Herz eine geringere prozentuale Beteiligung am Stoffwechsel aufweist, sie beträgt für das innervierte Herz beim Ruheminutenvolumen etwa 5—7%. Wir werden demnächst genauere Zahlen über den Lungengaswechsel auf Grund neuerer Versuche veröffentlichen.

Der zweite Einwand betrifft die Schätzung des Coronarvolumens und des dadurch möglichen Fehlers bei der Berechnung der Herzarbeit. Eine genauere Betrachtung zeigt, daß selbst grobe Schätzungsfehler die Resultate nicht wesentlich beeinträchtigen. Bei einer Verschätzung um 50% für ein Herz von 80 g und ein Minutenvolumen von 200 ccm beträgt der Fehler 8,7%, für 400 ccm 5,2% und 800 ccm 2,7%, er liegt mithin innerhalb der von uns bestimmten Fehlergrenze der Gesamtmethode von 10% für ein und dasselbe Herz. Für Vergleiche verschiedener Herzen unter sonst gleichen Bedingungen haben wir die Fehlergrenze aus Gründen der Wahrscheinlichkeit auf 20% festgesetzt. Beim denervierten H.L.P. kommt es mit Eintreten der energetischen Insuffizienz infolge des erhöhten O_2-Bedarfs zu einer wachsenden Erweiterung der Coronarien und einer entsprechenden Durchblutungssteigerung, wodurch der Schätzungsfehler stärker ins Gewicht fallen würde. Wenn man aber, wie dies in unseren Versuchen geschah, den Innervationsausfall durch Dauerinfusionen der Überträgerstoffe der vegetativen Nervenwirkungen ausschaltet, so bleibt die zunehmende Insuffizienz im energetischen und dynamischen Sinne und die damit verbundene Coronarerweiterung aus.

Als einen weiteren Mangel der respiratorischen Methode bezeichnen Gollwitzer-Meier und Mitarbeiter die Trägheit der Sauerstoffverbrauchsmessungen, die es nicht gestattet, momentane Sauerstoffverbrauchsänderungen festzustellen. Es ist zuzugeben, daß die Sauerstoffverbrauchsänderungen mit einer Verzögerung von 1—3 Minuten an der Spirometerkurve sichtbar werden, während die Kramersche Messung der Sauerstoffsättigung des Blutes oder die Blutgasanalyse einer in einem bestimmten Augenblick entnommenen Blutprobe die Sauerstoffbedarfsänderungen schneller anzeigt. Wie wir schon früher [2, 3] betont haben, sind schnellere Sauerstoffverbrauchsänderungen als man mit der respiratorischen Methode fassen kann, seltene Ereignisse, wie z. B. die Adrenalinwirkung schnell zugeführter großer Dosen, bei der auch wir [2] die Sauerstoffsättigung vom Sinusblut bestimmten. Wenn an bestimmte Organe plötzliche Energieanforderungen herantreten, wie dies bei der sehr schnellen Arbeitsleistungssteigerung der Skeletmuskulatur der Fall ist, dann fällt dem Gesamtkreislauf nicht die Aufgabe der sofortigen Energielieferung mit einer gleichschnellen Herzbelastung zu, sondern die anaerobe Phase des Muskelchemismus stellt die momentan notwendige Energie unter Aufnahme einer Sauerstoffschuld zur Verfügung. Die Abtragung der Schuld durch die aerobe Restitution der anaeroben Energievorräte erfolgt durch Nachatmung während eines langen Zeitraumes. Es wird z. B. der 100-m-Lauf ohne nennenswerte Erhöhung der Verbrennungsvorgänge, d. h. also ohne Herzbelastung, vollbracht, die Nachatmung der eingegangenen Sauerstoffschuld wird aber auf die Zeit einer halben Stunde verteilt. Daher laufen Änderungen der Energieumsetzungen des Herzens meistens verhältnismäßig langsam ab, so daß sie mit der respiratorischen Methode zeitgetreu registriert werden können.

---

[10] J. Physiol. (Brit.) **46**, 413 (1913).

Bei der externen Methode der Sauerstoffverbrauchsbestimmung durch Messung des Coronarvolumens und der Sauerstoffdifferenz (ΔO_2), wie sie Rühl [38, 39] und Gollwitzer-Meier [9, 13] und Mitarbeiter anwenden, wird nur der durch den Coronarsinus abfließende Anteil des gesamten Coronarminutenvolumens gemessen. Nach Anreps Untersuchungen beträgt der Sinusanteil etwa $^2/_3$ des Gesamtvolumens, er kann bei verschiedenen Herzen ziemlich von diesem Wert abweichen, soll aber für ein und dasselbe Herz konstant sein. G. K. Moe und M. B. Visscher [11] haben sich in einer sehr schönen Arbeit eingehend mit einem Vergleich der beiden Methoden der Sauerstoffverbrauchsmessung befaßt. Sie benutzten eine Modifikation des H. L. P. nach Daly und Thorpe [12], wo die Lunge durch einen Oxygenator ersetzt ist und beide Herzhälften nebeneinander arbeiten. Es ist bei diesem Präparat möglich, neben dem Blut aus dem Coronarsinus den anderen Anteil des Coronarvolumens, der aus den Venae Thebesii direkt in den rechten Ventrikel fließt, zu messen. Die nebenstehende Tabelle 2 (Arbeit Moe und Visscher) orientiert über die Vorgänge bei einer zunehmenden Herzinsuffizienz, wie sie sich im Verlaufe des unbeeinflußten H. L. P. mehr oder weniger langsam entwickelt. Wir sehen einmal, daß der Sinusanteil des Coronarvolumens veränderlich ist und in diesem Falle 46,8—52—18,5% der Gesamtmenge beträgt. Daneben stellten die Autoren fest, daß die Sauerstoffsättigung des abfließenden Blutes der beiden Coronargefäßgebiete sehr erhebliche Unterschiede aufweisen kann. Wenn man nach dem Verfahren von Rühl und Gollwitzer-Meier und Mitarbeitern das Coronarvolumen zu 60% der Gesamtdurchblutung nimmt, und ebenfalls der Berechnung des Sauerstoffverbrauchs die Sauerstoffdifferenz des Coronarsinus zugrunde legt, so bekommt man beim vorliegenden Falle Sauerstoffverbrauchswerte, die Abweichungen von — 18, — 21, — 67% gegenüber den tatsächlichen aufweisen.

Die Beobachtung, daß die Sauerstoffdifferenz der beiden Coronarstromgebiete erhebliche Unterschiede aufweisen kann, ist von außerordentlicher Bedeutung. Sie ist keineswegs überraschend, wenn man an die Unterschiede des Sauerstoffbedarfs des linken und rechten Herzens denkt, wie sie sich aus den verschiedenen Anforderungen ergeben. Außerdem scheinen Übereinstimmungen beider

Tabelle 2 (Arbeit Moe und Visscher).

Zeit	I Anteil der V. Thebesii			II Coronarsinusanteil			I + II Totaler O_2-Verbrauch ccm/Min. (gemessene Werte)	O_2-Verbrauch berechnet auf Basis des ΔO_2 des Coronarsinus		O_2-Verbrauch nach Rühl und Gollwitzer-Meyer	Anteil des Coronarsinusvolumens am Gesamtcoronarvolumen	Fehler des berechneten O_2-Verbrauchs aus Coronarsinus O_2-Differenz und Gesamtcoronarvol.	Fehler der O_2-Verbrauchsberechnung aus ΔO_2 Coronarsinus und Coronarvolumen (60% Anteil)
	ΔO_2	Volumen	O_2-Verbrauch	ΔO_2	Volumen	O_2-Verbrauch		Gemessene Coronargesamt-Volumen	O_2-Verbrauch				
Min.	%	ccm/Min.	ccm/Min.	%	ccm/Min.	ccm/Min.		ccm/Min.	ccm/Min.	ccm/Min.	%	%	%
0	2,48	57,6	1,425	4,06	50	2,03	3,455	107,6	4,37	2,84	46,8	+ 26,5	— 18
35	3,53	43,0	1,57	4,33	44	1,91	3,48	87,0	3,77	2,75	52	+ 6	— 21
103	2,09	119,0	2,49	2,48	27	0,68	3,17	146,0	3,62	0,94	18,5	+ 14,2	— 67

[11] Amer. J. Physiol. **125**, 461 (1939).
[12] J. Physiol. (Brit.) **79**, 199 (1933).

Tabelle 1 (Arbeit Moe und Visscher).

Versuch Nr.	O_2 arteriovenöse Differenz		I / II	Abweichung Sinus ΔO_2 von Thebesii ΔO_2
	V. Thebesii I %	Sinus Coronarius II %	%	%
Ia	2,48	4,06	0,61	+ 39
Ib	3,53	4,33	0,81	+ 18,5
Ic	2,09	2,48	0,84	+ 16
IIa	4,07	4,00	1,02	— 1,75
IIb	4,11	2,67	1,54	— 53,0
IIc	4,68	2,74	1,71	— 70,8

ΔO_2 der seltenere Fall zu sein. Aus der vorstehenden Tabelle 1 (Arbeit Moe und Visscher) sehen wir in 6 Fällen nur einmal eine Übereinstimmung, sonst recht erhebliche Unterschiede der arterio-venösen Sauerstoffdifferenzen des Coronarsinus und des V. Thebesiiblutes. Es können sich daher bei der Berechnung des Gesamtsauerstoffverbrauchs aus der Coronarsinus-ΔO_2 und dem Coronarminutenvolumen nur aus dem Sättigungsunterschied des Coronarblutes allein bei der genauen Größe des Gesamtcoronarvolumens nach den Erfahrungen von Moe und Visscher Fehler bis 50% ergeben. Wenn aber dazu noch die Schätzungsfehler des Volumenanteils der V. Thebesii bei alleiniger Messung des Coronarsinusvolumens treten, so erfährt der Fehler eine weitere Zunahme (siehe Tabelle 2, Arbeit Moe und Visscher). Durch diese Tatsachen unterliegt der Wert von Beobachtungen, die sich allein auf die externe Methode stützen, einer erheblichen Einschränkung, die dahin geht, daß für quantitative Stoffwechseluntersuchungen am Herzen die Sauerstoffdifferenzmethode vollkommen unbrauchbar ist. Die amerikanischen Autoren haben weiterhin in ihren Versuchen einen Vergleich der internen mit der externen Methode angestellt, wobei sie übereinstimmende O_2-Werte erhalten, wenn sie das Gesamtcoronarvolumen und die beiden ΔO_2-Werte nach ihrer Methode bestimmten. Der Wert der externen Methode lag um etwa 5—7% niedriger als der der internen, was sie auf die Tatsache zurückführen, daß etwa 5—7% des Blutes der V. Thebesii direkt in den linken Ventrikel fließen. Nach ihren Erfahrungen kommt es besonders bei Änderungen der Herzarbeit durch Minutenvolumen, Aortendruck und ganz besonders bei Herzinsuffizienzen zu den eben beschriebenen Verschiebungen der Coronarvolumenanteile und der Sauerstoffsättigung.

Wir haben bereits früher[2] gezeigt, daß sich in Tabellen von Gollwitzer-Meier[13] Beispiele finden, wo Steigerungen der Arbeitsleistung durch Minutenvolumenvermehrung mit unverändertem oder auch niedrigerem Sauerstoffverbrauch verknüpft waren. Wir haben diese Werte als falsch betrachtet und gleichfalls die auf solcher Basis errechneten Wirkungsgrade als unmöglich und irreführend bezeichnet. Rühl hat in seinen Arbeiten mit der externen Methode festgestellt, daß die Herzinsuffizienz mit einer Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs und einer entsprechenden Erhöhung des Wirkungsgrades verbunden sei. Das Paradoxon einer verbesserten Ökonomie des insuffizienten Herzens versucht er dadurch zu erklären, daß die Energielieferung in diesem Falle vorwiegend anaerob sei. Dabei muß man bedenken, daß die Restitution der anaeroben Energievorräte durch die Verbrennungsvorgänge erfolgt, so daß bei der Herzinsuffizienz ihre totale Erschöpfung außerordentlich viel schneller vor sich gehen müßte, als es in Wirklichkeit der Fall ist. Wie Starling und Visscher[11] und wir[1, 2] feststellen konnten, ist der O_2-Verbrauch beim insuffizienten Herzen viel höher als unter normalen Umständen, d. h. ein insuffizientes Herz arbeitet mit einem schlechteren Wirkungsgrad.

[13] Pflügers Arch. **237**, 68 (1936). — [14] J. Physiol. (Brit.) **62**, 243 (1927).

Peters und Visscher[15] und Moe und Visscher[11] haben diese Beobachtungen erneut erhärtet und bestätigt. Durch die eben diskutierten Beobachtungen von Moe und Visscher[11] werden die gegenteiligen Befunde verständlich, denn aus der ΔO_2-Coronarsinus und dem Sinusminutenvolumen ergibt sich aus Tabelle 2 der Autoren, daß der auf dieser Grundlage errechnete Sauerstoffverbrauch mit zunehmender Herzinsuffizienz geringer wird und im Maximum den wirklichen Wert um 67% unterschreitet. Aus diesem Beispiel ersieht man, daß unter bestimmten Umständen die externe Methode sogar für qualitative Bestimmungen des O_2-Verbrauchs unbrauchbar ist, wenn es darauf ankommt, den Gang und die Richtung einer Stoffwechseländerung festzustellen.

M. B. Visscher kommt auf Grund seiner Beobachtungen und langen Erfahrung zu dem Schluß, daß die respiratorische Bestimmung des Herzsauerstoffverbrauchs die zuverlässigste und deshalb die einzige wirklich brauchbare Methode ist. Eine Ansicht, die wir[2, 3] auf Grund unserer Beobachtungen schon früher vertreten haben, da zur Beurteilung energetischer Fragen die quantitativ genaue Sauerstoffbestimmung über lange Zeit die wichtigste Forderung ist.

Die vorliegende Fragestellung wurde in 30 Versuchen am H.L.P. mit einer mittleren Versuchsdauer des Einzelversuchs von 9 Stunden 50 Minuten durchgeführt. Der Blutzucker wurde nach Hagedorn-Jensen bestimmt. Der Zuckerverbrauch konnte aus der genau bekannten Gesamtblutmenge und der Blutzuckerdifferenz berechnet werden. Es ist außerordentlich wichtig, daß derartige Versuche nur unter der Beachtung einer einwandfreien Sterilität der Apparatur und bei der Präparation durchgeführt werden können, denn eine Infektion, z. B. mit Bacterium coli, macht quantitative Kohlehydratstoffwechselversuche deshalb unmöglich, weil mehr oder weniger große Zuckermengen von diesen Bakterien verbraucht werden. Für die Berechnung des calorischen Äquivalents des verbrauchten Sauerstoffs wurde der Wert von 5,14 cal pro ccm zugrunde gelegt.

Kohlehydratstoffwechsel und Sauerstoffverbrauch und ihre Beeinflussung durch Insulin, Azetylcholin und Adrenalin.

Aus den wertvollen Untersuchungen von Starling und Visscher[14] ergibt sich, daß eine dynamische Herzinsuffizienz mit einer pathologischen Sauerstoffverbrauchssteigerung verbunden ist. Wir[1] haben am innervierten H. L. P. zeigen können, daß die Ausschaltung der Innervation eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs bei unveränderter dynamischer Leistungsfähigkeit zur Folge hat. Die weitere Analyse ergab dann[2], daß das Zurücktreten der assimilatorischen Vagusfunktion und das damit verbundene stärkere Hervortreten der dissimilatorischen Sympathicuswirkung für diesen Vorgang verantwortlich ist. In Untersuchungen, die gemeinsam mit Zinnitz[16] am Spinaltier durchgeführt wurden, zeigte sich, daß auch am ganzen Tier diese Sparwirkung durch eine Vagusreizung wirksam wird.

Die Trennung vom Vaguszentrum bewirkt am isolierten Herzen den Ausfall der zentralen Stoffwechselsteuerung. Es besteht zwar anfänglich eine periphere Vagusrestfunktion, die später in langsam zunehmendem Maße zurückgeht. Dieser Prozeß macht sich an einer Sauerstoffverbrauchs-

[15] Amer. Heart J. **11**, 273 (1936). — [16] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **188**, 79 (1937).

steigerung, die von einem gewissen Zeitpunkt (1—3—4 Stunden) an stärker zunimmt, geltend. In ihrem Gefolge tritt dann später eine dynamische Herzinsuffizienz auf. Wir haben die Verschlechterung des Wirkungsgrades, die als Vorläufer der Herzinsuffizienz auftritt und ihre Ursache im Ausfall der assimilatorischen Vaguswirkung hat, als energetische Insuffizienz bezeichnet.

Die nächste Frage, die sich aufdrängte, war, ob der Kohlehydratstoffwechsel eine Rolle bei diesen Vorgängen spielte und welcher Art diese sein konnte. Wir gingen so vor, daß wir am unbeeinflußten Präparat in einer mehrstündigen Vorperiode Sauerstoff- und Zuckerverbrauch feststellten. Dabei zeigte sich, wie aus dem Beispiel des folgenden Versuchs (Abb. 1 und Tabelle 1) hervorgeht, daß in der ersten Stunde das calorische

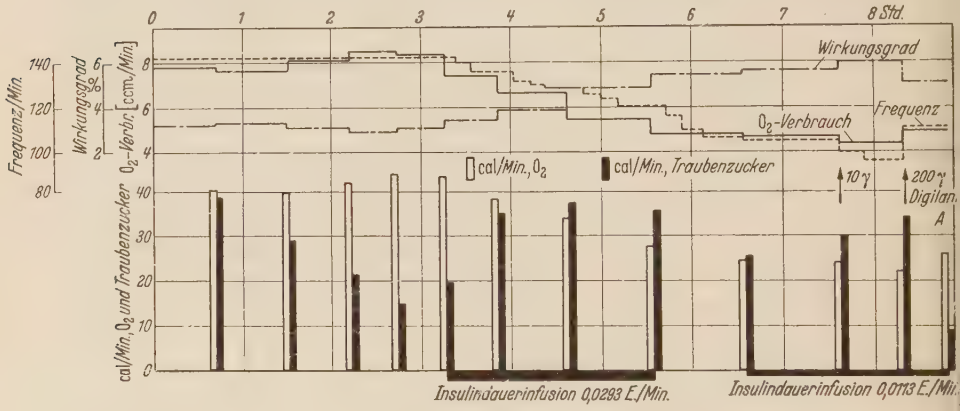


Abb. 1. Versuch Nr. 28 vom 18. II. 39, H. L. P., Körpergewicht 12,2 kg, Herzgewicht 102 g. □ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Äquivalent des verschwundenen Zuckers mit dem des verbrauchten Sauerstoffs nahezu übereinstimmt. Dieses Verhalten konnten wir in allen unseren Versuchen (Abb. 1—12 und Tabellen 1—12) feststellen. In den folgenden Stunden nimmt zuerst der Zuckerverbrauch aus dem Blute bei noch konstantem Sauerstoffverbrauch um 27,5—54 % ab. In der dritten Stunde kommt es dann zu einer mäßigen Sauerstoffverbrauchszunahme bei unveränderter dynamischer Leistungsfähigkeit des Herzmuskels. Durch eine Insulindauerinfusion von 0,0293 E Insulin pro Minute wird eine Änderung in dem Sinne erreicht, daß bei sinkendem Sauerstoffverbrauch zuerst eine äquivalente Menge Zucker verschwindet und späterhin sogar mehr als der Verbrennung entspricht, dabei tritt als eine konstante Erscheinung eine Pulsverlangsamung auf. Die Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs unter der Insulinwirkung haben wir bereits in früheren Versuchen[2] beobachtet. Sie beträgt in diesem Versuch 11,7—21—35 %, und hält sich damit in mäßigen Grenzen.

Tabelle 1.

Datum: 18. II. 38, Versuch Nr. 28, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 12,2 kg, Herzgewicht: 102 g, Präparationsdauer: 20 Min., Versuchsdauer: 12 Std. 45 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	40	142	250	108	0,554	7,81	76,5	17,11	40,2	38,4	3,24
2	45	142	250	108	0,554	7,67	75,2	16,80	39,5	28,6	3,30
3	30	142	250	108	0,554	8,08	79,4	17,70	41,5	21,0	3,13
4	30	142	250	108	0,554	8,44	82,8	18,50	43,4	15,0	2,99
5	30	142	250	108	0,554	8,32	81,6	18,24	42,8	19,5	3,04
		6–8. Insulindauerinfusion = 124′ = 0,0293 E/Min.									
6	32	142–140–136	250	108	0,554	7,35	72,1	16,10	37,8	34,8	3,44
7	34	136–132–130–128	250	108	0,554	6,55	64,3	14,35	33,7	36,8	3,86
8	52	128–126–124–120	250	108	0,554	5,38	52,8	11,79	27,7	34,7	4,70
9	56	120–116–110–107	250	108	0,554	4,71	45,2	10,32	24,2	21,1	5,36
		10–12. Insulindauerinfusion = 119′ = 0,0113 E/Min.									
10	57	107	250	108	0,554	4,59	45,0	10,06	23,6	28,7	5,50
		11. 10,0 γ Digilanid A.									
11	40	100–96	250	108	0,554	4,30	42,2	9,42	22,1	26,4	5,88
		12. 200 γ Digilanid A.									
12	25	110 Irregularitäten	250	108	0,554	4,98	48,8	10,91	25,6	9,2	5,08

Tabelle 2.

Datum: 18. I. 38, Versuch Nr. 1, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 15,0 kg, Herzgewicht: 118 g, Präparationsdauer: 20 Min., Versuchsdauer: 6 Std. 40 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	50	120	270	132	0,726	8,30	70,1	18,17	42,7	35,2	3,95
2	65	120	270	132	0,726	8,45	71,5	18,50	43,4	29,6	3,92
		3. Insulindauerinfusion 64′ = 0,0188 E/Min.									
3	57	118	270	132	0,726	5,29	44,8	15,80	27,2	36,7	4,59
		4–5. Insulindauerinfusion 120′ = 0,0315 E/Min.									
4	58	116	270	132	0,726	4,83	40,9	10,59	24,7	38,1	6,85
5	60	116	270	132	0,726	4,90	41,5	10,72	25,2	44,0	6,76

Der Abfall des Zuckerverbrauchs aus dem Blute schon in der zweiten Stunde ist sehr gut auch aus dem in Tabelle 2 wiedergegebenen Ver-

such zu ersehen, wo bei gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch das calorische Äquivalent des Zuckerverbrauchs um 31 % zurückgeht. Insulindauerinfusionen über 3 Stunden führen zu einer Senkung des Sauerstoffverbrauchs um 25—40 %, während der Zuckerverbrauch um 24—49 % gegen den Vorwert (Tabelle 2, Nr. 2) ansteigt.

Wir haben einmal die Bilanzen aus den beiden Versuchen (Nr. 28, Tabelle 1 und Abb. 1, Nr. 1, Tabelle 2) in Tabelle 3 nebeneinandergestellt.

Tabelle 3.

Versuchs-Nr. und Tabelle	Periode	Zeit in Min.	Gesamt-O_2 Verbrauch cal	Gesamt-Zucker-Verbrauch aus Blut cal	O_2 cal/Min.	Zucker cal/Min.	Aus O_2- und Zuckerverbrauch errechnete Menge gebildeten oder abgebauten Glykogens				
							in Prozent des O_2-Verbrauchs		in g Zucker		% des Herzgewichtes
							Anbau	Abbau	Anbau	Abbau	
1 Tab. 2	1-2	115	4947	3850	43,0	33,5	0	22,1	0	1,10	— 0,94
	Insulindauerinfusion 0,025 E/Min.										
	3-5	175	4494	6840	25,7	39,7	54,4	0	2,35	0	+ 1,99
28 Tab. 1	1-5	175	7213	4290	41,3	24,5	0	40,7	0	2,92	— 2,86
	Insulindauerinfusion 0,0293 E/Min.										
	6 8	118	3795	4168	32,1	35,4	10,3	0	0,37	0	+ 0,36

Unter der vereinfachenden Annahme, daß beim Herzen die Gesamtenergie durch Kohlehydratverbrennung geliefert und daß der über die Verbrennung hinaus verschwindende Zucker als Glykogen angelagert wird, ergibt sich, daß ohne Insulin dauernd Herzglykogen gebraucht wird. Je länger die Vorperiode ohne Insulin dauert, eine um so größere Glykogenmenge muß angegriffen werden. Bei 115 Minuten (Versuch 1, Tabelle 2, Nr. 1—2) werden 22,1 % des calorischen Bedarfs aus dem Herzglykogen gedeckt, bei 175 Minuten (Versuch 28, Tabelle 1, Nr. 1—5) 40,7 %, d. h. aufs Herzgewicht bezogen 0,94 % bei der kurzen und 2,86 % bei der langen Versuchsperiode ohne Insulin.

Im übrigen ist das calorische Äquivalent des Sauerstoffs für beide Herzen (bei annähernd gleicher Arbeit und gleichem Gewicht) im Vorversuch fast übereinstimmend. Dies scheint uns deshalb erwähnenswert, weil Gollwitzer-Meier[17] die Behauptung aufstellt, daß man an verschiedenen H. L. P. keine vergleichbaren Werte des Sauerstoffverbrauchs bekomme. Nach unseren Erfahrungen ist dies immer der Fall, wenn man die gleichen Vorbedingungen einhält.

Unter der Insulinwirkung kommt es in Versuch 1 (Tabelle 2, Nr. 3 -5), wie dies aus Tabelle 3 ersichtlich wird, zu einer erheblichen Zuckerassimilation, denn die verschwundene Zuckermenge übersteigt das calorische

[17] Klin. Wschr. **1939**, S. 869.

Äquivalent des Sauerstoffs um 54,4 %. Nach der längeren Vorperiode ohne Insulin (Versuch 28, Tabelle 1 und Abb. 1) übersteigt die durch die assimilatorische Insulinwirkung bedingte Zuckerassimilation nur um 10,3 % den Sauerstoffverbrauch.

Das langsame Eintreten der Insulinwirkung am Herzen wird besonders deutlich, wenn man kleinere Mengen anwendet, wie dies im nebenstehenden Versuch Nr. 12 (Abb. 2 und Tabelle 4, Nr. 1—5) geschehen ist. In der

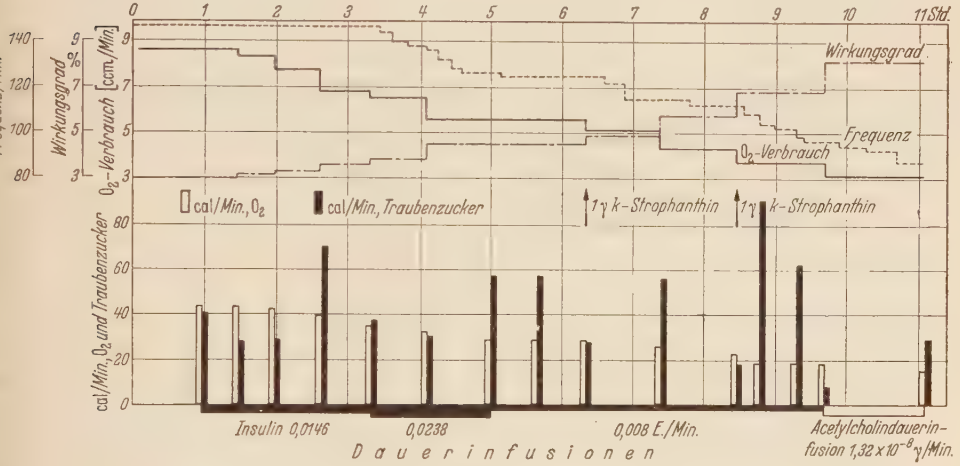


Abb. 2. Versuch Nr. 12 vom 18. V. 38, H. L. P., Körpergewicht 7,8 kg, Herzgewicht 85 g.
□ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Tabelle 4.

Datum: 18. V. 38, Versuch Nr. 12, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 7,8 kg, Herzgewicht: 85 g, Präparationsdauer: 17 Min., Versuchsdauer: 12 Std. 30 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	59	148	275	108	0,573	8,66	102,0	18,96	44,5	41,2	3,02
		2–5. Insulindauerinfusion 151′ = 0,0146 E/Min.									
2	30	148	275	108	0,573	8,64	101,6	18,92	44,4	28,2	3,03
3	30	148	275	108	0,573	8,44	99,3	18,50	43,4	29,4	3,10
4	39	148	275	108	0,573	7,86	92,4	17,11	40,4	70,6	3,34
5	43	148	275	108	0,573	6,93	81,5	15,17	35,6	37,5	3,77
		6–7. Insulindauerinfusion 89′ = 0,0238 E/Min.									
6	49	148–146–142–140	275	108	0,573	6,60	77,7	14,46	33,9	31,1	3,96
7	54	138–134–130–128	275	108	0,573	5,65	66,4	12,37	29,0	57,5	4,63
		8–14. Insulindauerinfusion 310′ = 0,008 E/Min.									
8	40	128–126	275	108	0,573	5,65	66,4	12,37	29,0	57,5	4,63
9	40	126	275	108	0,573	5,65	66,4	12,37	29,0	28,2	4,63

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
					10. 1,0 γ Strophanthin.						
10	63	126–124–116	275	108	0,573	5,19	61,0	11,36	26,7	56,5	5,04
11	64	116–114	275	108	0,573	4,37	51,4	9,57	23,0	18,5	5,90
					12. 1,0 γ Strophanthin.						
12	20	114–110	275	108	0,573	3,75	44,1	8,22	19,3	90,4	6,97
13	30	106–104	275	108	0,573	3,75	44,1	8,22	19,3	62,2	6,97
14	25	100–98–98	275	108	0,573	3,75	44,1	8,22	19,3	8,2	6,97
					15. Azetylcholindauerinfusion 85′ = $1{,}32 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.						
15	84	98–96–96–94–90–88	275	108	0,573	3,15	37,0	6,90	16,2	29,6	8,30

ersten Stunde der Infusion von 0,0146 E/Min. ist der Zuckerverbrauch niedriger als in der Vorperiode, in der zweiten Stunde (Tabelle 4, Nr. 4) kommt es dann zu einer erheblichen assimilatorischen Wirkung, die in der dritten Stunde wieder nachläßt (Tabelle 4, Nr. 5), allerdings entspricht der Zuckerverbrauch (Tabelle 4, Nr. 5) immer noch der verbrannten Menge. Eine Steigerung der Insulinmenge auf 0,0238 E/Min. führt nun nochmals zum Verschwinden einer über das calorische Sauerstoffäquivalent um 98,3 % hinausgehenden Zuckermenge (Tabelle 4, Nr. 7), die in einer Nachperiode bei einer kleinen Insulinmenge von 0,008 E/Min. (Tabelle 4, Nr. 9) wieder der Verbrennung äquivalent wird.

Wir möchten hier auch auf die langsame Entwicklung der Sauerstoffsparwirkung und den späten Eintritt der Bradycardie, die erst nach zweistündiger Insulindauerinfusion (Tabelle 4, Nr. 5) eintritt, hinweisen.

Auch der folgende Versuch Nr. 2 (Abb. 3 und Tabelle 5) zeigt das Moment der langsamen Entstehung des Insulineinflusses ganz deutlich. Hier ist die Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel diejenige, welche im Vordergrund steht, man kann sogar sagen, daß der Einfluß auf die Zuckerassimilation in diesem Falle (Tabelle 5, Nr. 3–6) unter der über 4 Stunden anhaltenden Insulindauerinfusion die einzige Wirkung darstellt. Allerdings ist in diesem Versuch der Ausgangssauerstoffverbrauch niedrig, was auf eine relativ starke Vagusrestfunktion hinweist, auch die niedrige Frequenz von 128 unterstützt unsere Anschauung. Ein Vergleich mit einem Herzen von annähernd gleicher Größe (Versuch Nr. 12, Tabelle 4, Nr. 1) zeigt, daß einem geringen Vagustonus eine Frequenz von 148 und ein um 37 % höherer Sauerstoffverbrauch entspricht.

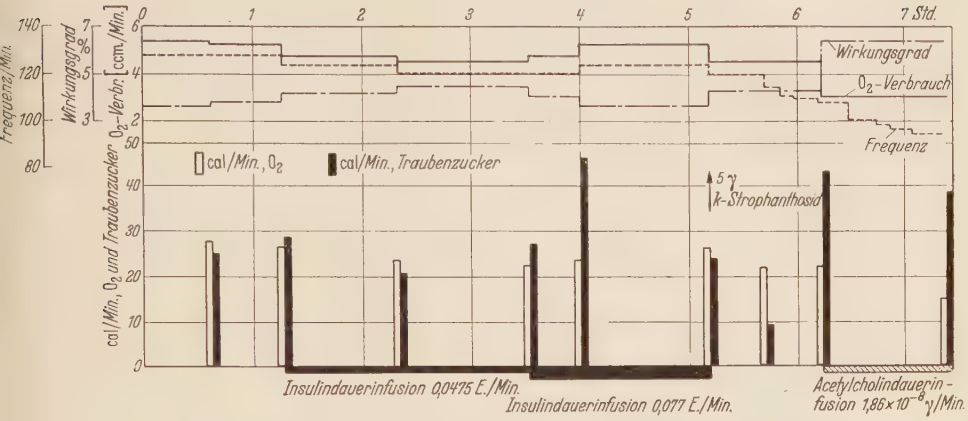


Abb. 3. Versuch Nr. 2 vom 1. II. 38, H. L. P., Körpergewicht 7,3 kg, Herzgewicht 80 g.
□ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Tabelle 5.

Datum: 1. II. 38, Versuch Nr. 2, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 7,3 kg, Herzgewicht: 80,0 g, Präparationsdauer: 16 Min., Versuchsdauer: 8 Std. 20 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	36	128	200	106	0,431	5,46	68,3	11,95	28,1	26,4	3,60
2	40	128	200	106	0,431	5,28	66,0	11,56	27,1	29,3	3,72
		3–4. Insulindauerinfusion 120′ = 0,0475 E/Min.									
3	62	124	200	106	0,431	4,72	59,0	10,35	24,3	21,4	4,16
4	73	120	200	106	0,431	4,47	55,9	9,80	23,0	28,6	4,40
		5. Insulindauerinfusion 20′ = 0,077 E/Min.									
5	28	120	200	106	0,431	4,86	60,8	10,65	25,0	47,0	4,04
6	72	124	200	106	0,431	5,32	66,5	11,75	27,3	25,0	3,67
		7. 5,0 γ k-Strophanthosid.									
7	30	120–114–	200	106	0,431	4,55	56,8	9,98	23,4	10,3	4,31
8	30	112–110	200	106	0,431	4,55	56,8	9,98	25,4	44,0	—
		8. Azetylcholindauerinfusion 80′ = $1{,}86 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.									
9	70	110–100–98–96–94	200	106	0,431	3,01	37,6	6,60	15,5	44,0	6,52

Wir haben nur wenig Versuche mit größeren Insulinmengen gemacht, von denen wir den umstehenden (Abb. 4, und Tabelle 6) wiedergeben. Bei einer Dauerinfusion von 0,395 E/Min. kommt es zu einer Sauerstoffverbrauchssteigerung und Zuckerassimilationshemmung, erst unter der Wirkung von 0,0246 E Min. tritt eine langsame Entwicklung einer Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch mit einem ihm äquivalenten Zucker-

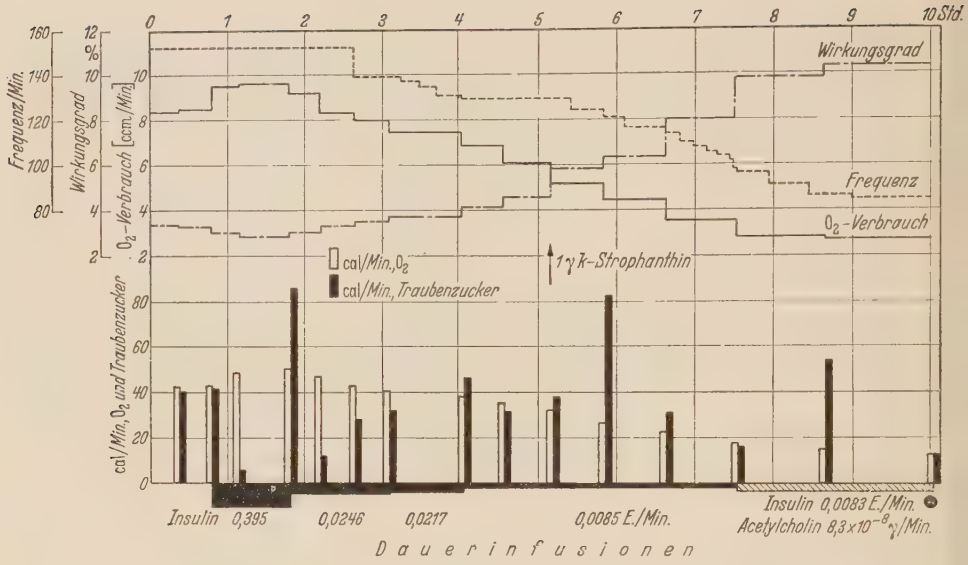


Abb. 4. Versuch Nr. 13 vom 24. V. 38, H. L. P., Körpergewicht 10,4 kg, Herzgewicht 95 g. □ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Tabelle 6.

Datum: 24. V. 38, Versuch Nr. 13, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 10,4 kg, Herzgewicht: 95 g, Präparationsdauer: 16 Min., Versuchsdauer: 10 Std. 40 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	22	152	300	110	0,636	8,45	89,0	18,50	43,4	40,2	3,43
2	25	152	300	110	0,636	8,54	89,9	18,70	43,8	42,8	3,40
		3–4. Insulindauerinfusion 60′ = 0,395 E/Min.									
3	22	152	300	110	0,636	9,60	101,0	21,00	49,3	5,5	3,03
4	38	152	300	110	0,636	9,74	102,5	21,30	50,1	86,3	2,98
		5–7. Insulindauerinfusion 71′ = 0,0246 E/Min.									
5	25	152	300	110	0,636	9,26	97,5	20,30	47,6	11,9	3,13
6	26	152	300	110	0,636	8,40	88,4	18,40	43,2	28,4	3,45
7	26	140	300	110	0,636	8,02	84,4	17,55	41,2	32,8	3,62
		8. Insulindauerinfusion 57′ = 0,0217 E/Min.									
8	57	140–138–136–132	300	110	0,636	7,56	79,6	16,55	38,9	46,3	3,84
		9–13. Insulindauerinfusion 223′ = 0,0085 E/Min.									
9	31	130	300	110	0,636	6,96	73,2	15,25	35,8	34,2	4,17
10	36	130	300	110	0,636	6,25	65,7	13,66	32,1	38,8	4,66

Tabelle 6 (Fortsetzung).

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
					11. 1,0 γ k-Strophanthin.						
11	39	130–126	300	110	0,636	5,32	56,6	10,65	27,3	83,0	5,97
12	47	122–118	300	110	0,636	4,57	48,1	10,00	23,5	30,4	6,36
13	54	116–112–110–108–106–104–100	300	110	0,636	3,60	37,9	7,89	18,5	16,0	8,06
					14–15. D.I. = 154′ = 0,0083 E Insulin/Min. + $8{,}3 \cdot 10^{-8}$ γ Acetylcholin/Min.						
14	66	98–92–87	300	110	0,636	2,91	30,6	6,38	15,0	54,7	9,96
15	83	87–86–86	300	110	0,636	2,78	29,3	6,09	14,3	14,1	10,48

verbrauch aus dem Blute ein. Ein Zustand, der durch die noch kleinere Insulinmenge von 0,0085 E Min. weiter unterhalten wird. Es hat den Anschein, als ob durch Überdosierung des Insulins Wirkungen auftreten, die nicht mehr als physiologisch angesehen werden können.

Ob die Sauerstoffverbrauchssteigerung und die Hemmung des Zuckerverbrauchs als direkte Wirkungen des Insulins angesprochen werden müssen oder ob es sich dabei um einen durch die Überdosierung hervorgerufenen gegenregulatorischen Kompensationsvorgang von seiten des peripheren Sympathicus handelt, muß einer Entscheidung durch spätere Untersuchungen vorbehalten werden. Wir möchten annehmen, daß der letztere Vorgang der wahrscheinlichere ist.

Die Insulinwirkung auf die Zuckerassimilation des Herzens wurde zuerst überzeugend von Burn und Dale[18] gezeigt. Sie beobachteten, daß unter Insulin in kleinen Mengen (1 : 500000) mehr Zucker aus dem Blute verschwand und weniger Kohlensäure gebildet wurde als vorher. Es bilden also unsere Beobachtungen eine Bestätigung und Erweiterung der Befunde von Burn und Dale.

Wie Gremels und Zinnitz[16] gesehen hatten, kommt es unter einer länger dauernden Vagusreizung an der Spinalkatze neben einer Sparwirkung auf den Sauerstoffverbrauch zu einem erheblichen Zuckerschwund aus dem Blute, der als eine Zuckerassimilation gedeutet wurde. Es lag nahe, diese Vaguswirkung auch am Herzen zu untersuchen. Wir bedienten uns der von uns erprobten Methode[2] der Dauerinfusion des Vagusüberträgerstoffes Azetylcholin. Der folgende Versuch (Abb. 5 und Tabelle 7) zeigt, daß nach einer Vorperiode, in der vorwiegend Kohlehydrat verbrannt wird, durch eine Azetylcholindauerinfusion von $1.7 \cdot 10^{-5}$ γ/Min. neben der Sparwirkung auf den Sauerstoff-

[18] J. Physiol. (Brit.) **54**, 164 (1924).

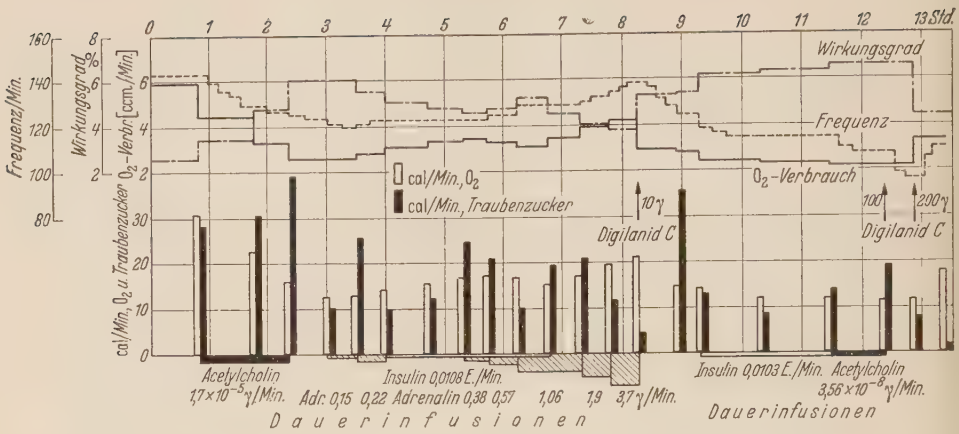


Abb. 5. Versuch Nr. 20 vom 29. XI. 38, H. L. P., Körpergewicht 8,0 kg, Herzgewicht 81 g.
□ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Tabelle 7.

Datum: 29. XI. 38, Versuch Nr. 20, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 8,1 kg, Herzgewicht: 81 g, Präparationsdauer: 16 Min., Versuchsdauer: 13 Std. 30 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	48	144	160	100	0,344	5,95	73,6	13,01	30,6	28,4	2,64
		2–3. Azetylcholindauerinfusion 98′ = $1{,}7 \cdot 10^{-5}$ γ/Min.									
2	56	144–140–136–134–130	160	100	0,344	4,46	55,2	9,78	23,0	30,6	3,48
3	35	130–128	160	100	0,344	3,25	40,2	7,12	16,7	39,6	4,80
4	38	126–124	160	100	0,344	2,55	31,5	5,58	13,1	10,5	6,12
		5. Adrenalindauerinfusion 30′ = 0,15 γ/Min.									
5	29	122–120	160	100	0,344	2,55	31,5	5,58	13,1	25,5	6,12
		6. Adrenalindauerinfusion 30′ = 0,216 γ/Min.									
6	30	122–124	160	100	0,344	2,83	34,9	6,20	14,5	10,2	5,53
		7–11. Insulindauerinfusion 180′ = 0,0128 E/Min.									
7	42	124	160	100	0,344	3,07	37,9	6,73	15,8	12,3	5,11
8	34	124	160	100	0,344	3,26	40,3	7,14	16,8	24,5	4,82
		9. Adrenalindauerinfusion 30′ = 0,377 γ/Min.									
9	25	124	160	100	0,344	3,35	41,4	7,34	17,3	21,1	4,65
		10. Adrenalindauerinfusion 30′ = 0,565 γ/Min.									
10	30	126	160	100	0,344	3,27	40,4	7,16	16,9	10,2	4,81

Tabelle 7 (Fortsetzung).

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
		11–12. Adrenalindauerinfusion 60′ = 1,06 γ/Min.									
11	32	130	160	100	0,344	3,03	37,5	6,64	15,6	19,5	5,26
12	31	130	160	100	0,344	3,44	42,5	7,54	17,7	21,1	4,56
		13. Adrenalindauerinfusion 30′ = 1,9 γ/Min.									
13	30	132–134	160	100	0,344	3,91	48,3	8,57	20,1	12,3	4,02
		14. Adrenalindauerinfusion 30′ = 3,66 γ/Min.									
14	28	136–138–140	160	100	0,344	4,18	51,6	9,16	21,6	4,5	3,76
		15. 10 γ Digilanid C.									
15	40	140–138–136–130	160	100	0,344	2,92	36,2	6,40	15,0	36,0	5,38
16	20	130–126	160	100	0,344	2,84	35,2	6,22	14,6	13,6	5,53
		17–18. Insulindauerinfusion 130′ = 0,0103 E/Min.									
17	62	120–118–116	160	100	0,344	2,49	30,8	5,46	12,8	9,0	6,30
18	68	116	160	100	0,344	2,43	30,0	5,32	12,5	14,0	6,42
		19. Azetylcholindauerinfusion 58′ = $3{,}56 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.									
19	54	116–112–109	160	100	0,344	2,35	29,0	5,15	12,1	19,5	6,68
		20. 100 γ Digilanid C.									
20	30	108–100–98	160	100	0,344	2,38	29,4	5,22	12,3	8,6	6,60
		21. 200 γ Digilanid C.									
21	30	98–108–112 Extrasystolie	160	100	0,344	3,54	43,8	7,76	18,3	2,0	4,50

verbrauch eine das calorische Äquivalent des Sauerstoffs um 33 und 137 % übersteigende Zuckermenge aus dem Blute verschwindet. Die Sauerstoffverbrauchssenkung beträgt 24.8 und 45.2 %, sie ist also viel ausgesprochener als unter der Insulinwirkung. Bezieht man den Zuckerverbrauch auf den Wert der Vorperiode, so beträgt die absolute Steigerung der Zuckerassimilation 7,8 und 39,5 %.

Diese Beobachtung zeigt uns klar, daß auch am isolierten Organ durch Vagusstoffüberträgerwirkung die Zuckerassimilation gefördert wird. Unserer Auffassung nach handelt es sich hierbei um eine Wirkungsverstärkung der vorhandenen kleinen Insulinmengen, denn weder das Herz noch das Blut sind ja am Versuchsbeginn vollkommen frei von Insulin und anderen Hormonen. Für diese Annahme spricht die folgende Beobachtung: wenn man das Blut für das H. L. P.

steril entnimmt und 24—48 Stunden im Eisschrank aufbewahrt, dann hat das mit diesem Blute unter Traubenzuckerzusatz arbeitende Herz von Anfang an einen übermäßig hohen Sauerstoffverbrauch, der um 20 bis 40% höher liegt als der des mit Frischblut arbeitenden denervierten Herzens. Der Zuckerverbrauch aus dem Blute ist ganz gering und beträgt nur 10—25% des calorischen Sauerstoffäquivalents. Solche Herzen werden nach kurzer Zeit (1—2 Stunden) schon dynamisch insuffizient und erweisen sich gegen die Wirkung von Adrenalin und Sympatol wie auch der Digitalisglykoside als fast refraktär.

Es ist wohl anzunehmen, daß dieses Blut durch das lange Stehen wenig oder gar keine Hormone und daher u. a. auch kein Insulin mehr enthält, so daß die periphere Restfunktion des Vagus nur eine geringe Wirkungsmöglichkeit hat, aus der sich die eben angeführten Beobachtungen erklären würden.

Zu einem gewissen Teil könnte der mangelnde Zuckerverbrauch aus der Verbrennung der glykolytisch entstandenen Milchsäure, über deren Bedeutung Rühl[19] und C. Lovatt Evans, F. Grande und Fong Yen Hsu[20] berichtet haben, verstanden werden.

Aus früheren Untersuchungen[1, 2] können wir sagen, daß durch Insulin allein, das wir bei allen Versuchen am H. L. P. zugesetzt haben, zwar die energetische Insuffizienz hinausgeschoben wird, aber dann doch nach 4—8 Stunden eintritt.

An dieser Stelle möchten wir nun auf die wichtige Arbeit von L. E. Bayliss, E. A. Müller und E. H. Starling[7] eingehen, die sich unter anderem auch mit der Insulinwirkung am H. L. P. befaßt. Darin wurde einmal gezeigt, daß bei bereits eingetretener dynamischer Insuffizienz mit Sauerstoffverbrauchssteigerung und Herzdilatation durch Einzelgaben von Insulin eine Aufhebung dieser Insuffizienz erreicht wird, wobei der respiratorische Quotient bis zum reinen Zuckerverbrennungswert ansteigt.

Die Autoren legen den Hauptwert auf die Verkleinerung des diastolischen Herzvolumens durch die Insulinwirkung und sehen darin die Ursache der Sauerstoffverbrauchsherabsetzung. Aus diesem Grunde glauben sie eine spezifische Insulinwirkung auf die Verbrennungen ablehnen zu müssen. Wir kommen später noch einmal eingehend auf die Zusammenhänge zwischen diastolischem Herzvolumen und Sauerstoffverbrauch zurück.

Mit dem Insulin allein kann man, wie oben schon ausgeführt wurde, auf die Dauer die assimilatorischen Vorgänge nicht unterhalten. Bei längerdauernden Dauerinfusionen läßt die Wirkung nach.

---

[19] Klin. Wschr. **13**, 1411, 1529 (1934). — [20] Quart. J. exper. Physiol. **24**, 347 (1935).

Tritt aber eine Vaguswirkung durch eine Infusion des Überträgerstoffes hinzu, dann läßt sich der Zustand der Zuckerassimilation wieder steigern.

Das Zusammenwirken von Insulin und dem Vagusüberträgerstoff erkennt man gut aus der nebenstehenden Beobachtung (Abb. 6 und Tabelle 8), wo sich in einer zweistündigen Vorperiode das im Eingangsversuch

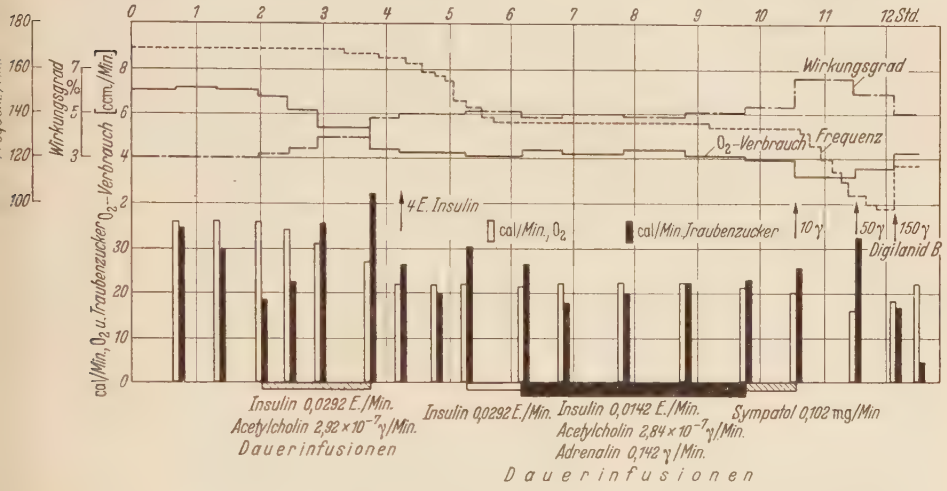


Abb. 6. Versuch Nr. 30 vom 24. II. 39, H. L. P., Körpergewicht 7,0 kg, Herzgewicht 84 g. □ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Tabelle 8.

Datum: 24. II. 39, Versuch Nr. 30, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 7,0 kg, Herzgewicht: 84 g, Präparationsdauer: 18 Min., Versuchsdauer: 12 Std. 50 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	45	168	200	109	0,444	6,97	83,0	15,26	35,8	34,6	2,91
2	40	168	200	109	0,444	7,03	83,8	15,40	36,1	30,0	2,88
3	40	168	200	109	0,444	6,95	82,8	15,24	35,7	18,3	2,92
		4–6. D. I. 119′ = 0,0292 E/Min. Insulin + $2{,}92 \cdot 10^{-7}$ γ/Min. Azetylcholin.									
4	30	168	200	109	0,444	6,67	79,5	14,62	34,3	22,5	3,04
5	30	168	200	109	0,444	6,06	72,2	13,27	31,2	35,4	3,35
6	50	168–166	200	109	0,444	5,29	63,0	11,60	27,2	42,0	3,83
7	30	166–164	200	109	0,444	4,29	51,1	9,40	22,1	26,0	4,72
		8. 4 E Insulin.									
8	35	164–162–158	200	109	0,444	4,14	44,3	9,07	21,3	19,4	4,89
9	30	156–150–145–142	200	109	0,444	4,20	50,0	9,20	21,6	30,1	4,82

Tabelle 8 (Fortsetzung).

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
		10. Insulindauerinfusion 60′ = 0,0292 E/Min.									
10	56	142–138–136	200	109	0,444	4,09	48,7	8,97	21,0	26,0	4,95
11–14.		D. I. 220′ = 0,0142 E/Min. Insulin + $2{,}84 \cdot 10^{-7}$ γ/Min. Azetylcholin + 0,142 γ/Min. Adrenalin.									
11	40	136	200	109	0,444	4,27	50,9	9,36	21,9	17,0	4,74
12	60	136	200	109	0,444	4,15	49,4	9,09	21,3	19,8	4,88
13	60	136	200	109	0,444	4,27	50,9	9,36	21,9	22,3	4,74
14	60	136–134	200	109	0,444	4,10	48,8	8,99	21,1	22,8	4,99
		15. Sympatoldauerinfusion 54′ = 0,102 mg/Min.									
15	50	134	200	109	0,444	3,95	47,0	8,65	20,3	25,4	5,13
		16. 10 γ Digilanid B.									
16	60	134–132–126–120–115–110–104	200	109	0,444	3,16	37,6	6,92	16,2	32,3	6,41
		17. 50 γ Digilanid B.									
17	40	104–100–98	200	109	0,444	3,50	41,7	7,67	18,0	16,8	5,79
		18. 150 γ Digilanid B.									
18	20	108	200	109	0,444	4,14	49,3	9,07	21,3	4,6	4,89

(Abb. 1 und Tabelle 1, Nr. 1—5) besprochene Verhalten der gehemmten Zuckerassimilation aus dem Blute entwickelt hat. In der nun folgenden Periode macht sich die Wirkung einer kombinierten Dauerinfusion von 0,0292 E/Min. Insulin und $2{,}92 \cdot 10^{-7}$ γ Azetylcholin in einer langsam zunehmenden Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch und einem über das calorische Äquivalent hinausgehenden Zuckerverbrauch geltend. Auch in diesem Versuch erkennt man (Tabelle 8, Nr. 4—6), daß die Sauerstoffsparwirkung und der fördernde Einfluß auf die Zuckerassimilation schon vor dem Eintritt der Bradycardie vorhanden sind. In einem späteren Versuchsabschnitt (Tabelle 8, Nr. 10) hat die gleiche Insulinmenge allein eine geringere Stoffwechselwirkung im eben besprochenen Sinne.

In diesem Zusammenhang möchten wir noch darauf hinweisen, daß die verstärkende Azetylcholinwirkung auf den Zuckerverbrauch mit einer Menge erreicht wird, die noch unterhalb der auf den Sauerstoffverbrauch wirksamen liegt.

Wie sich auch noch aus den übrigen Versuchen ergibt, ist die Vaguswirkung aufs engste mit der Insulinwirkung gekoppelt. Erst wenn beide zusammenwirken, kann das Auftreten der energetischen Insuffizienz auf die Dauer verhindert werden.

Worin ist nun außer der mangelhaften Vaguswirkung die Erscheinung der zunehmenden Abnahme des Zuckerverbrauchs aus dem Blute des H. L. P. noch begründet? An dieser Stelle möchten wir an eine frühere Erörterung[2], die das Eintreten der energetischen Insuffizienz betrifft, anknüpfen. Wir haben zeigen können, daß die langsam abnehmende Restfunktion des Vagus bei der von zentralen Einflüssen unabhängigen Sympathicuswirkung zu einem zunehmenden Überwiegen derselben führt.

Wie sieht nun dieser Sympathicuseffekt auf den Kohlehydratstoffwechsel des Herzens aus?

Wir wollen dies einmal am Beispiel einer Reihe von Adrenalindauerinfusionen betrachten, wie sie im nebenstehenden Versuch (Abb. 7 und Tabelle 9) durchgeführt worden sind. Eine kleine Adrenalinmenge von

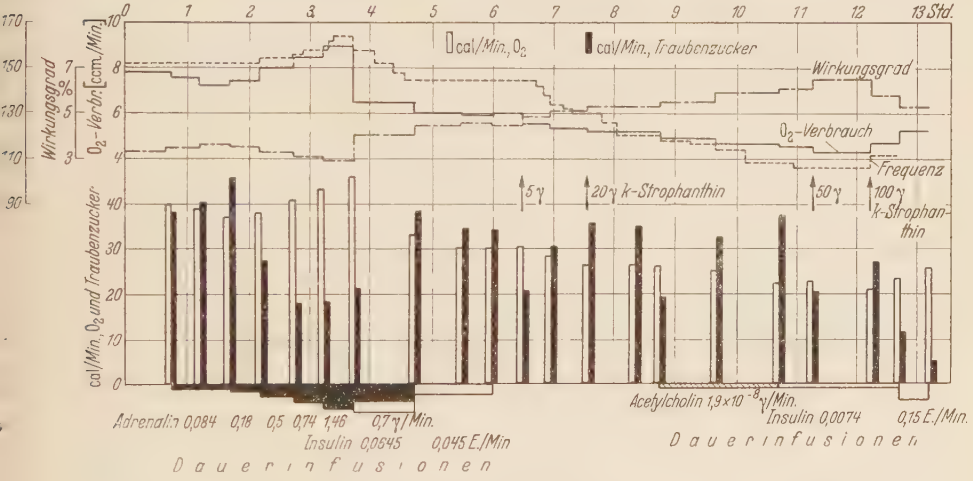


Abb. 7. Versuch Nr. 26 vom 31. I. 39, H. L. P., Körpergewicht 12,0 kg, Herzgewicht 133 g. □ = O_2 cal/Min., ■ Zucker cal/Min.

Tabelle 9.

Datum: 31. I. 39. Versuch Nr. 26. Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 12,0 kg, Herzgewicht: 133 g, Präparationsdauer: 15 Min., Versuchsdauer: 12 Std. 55 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm Min.	O_2 in ccm Min.	O_2 in ccm kg/Min.	O_2 in kgm Min.	O_2 in cal Min.	Zucker in cal Min.	Wirkungsgrad in %
1	45	152	267	102	0,578	7,78	58.5	17,05	40,0	38,0	3,38
		2–3. Adrenalindauerinfusion 60′ = 0,084 γ/Min.									
2	28	152	267	102	0,578	7,63	57,4	16,70	39,2	40,0	3,44
3	30	152	267	102	0,578	7,20	54,1	15,75	37,0	46,0	3,65
		4. Adrenalindauerinfusion 30′ = 0,18 γ/Min.									
4	30	152	267	102	0,578	7,43	55,8	16,26	38,2	26,8	3,54

Tabelle 9 (Fortsetzung).

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
		5. Adrenalindauerinfusion 30′ = 0,5 γ/Min.									
5	32	154	267	102	0,578	7,96	59,8	17,43	40,9	18,1	3,30
		6. Adrenalindauerinfusion 30′ = 0,74 γ/Min.									
6	30	154–156–158	267	102	0,578	8,44	62,8	18,50	43,3	18,5	3,12
		7. Adrenalindauerinfusion 30′ = 1,46 γ/Min.									
7	30	158–162–164	267	102	0,578	8,98	67,5	19,66	46,1	21,4	2,94
		8. D. I. 60′ = 0,7 γ/Min. Adrenalin + 0,0645 E Insulin/Min.									
8	60	158–152–148–144	267	102	0,578	6,48	48,7	14,18	33,3	38,4	4,08
		9–10. Insulindauerinfusion.									
9	47	144	267	102	0,578	5,89	44,3	12,89	30,3	34,5	4,48
10	28	144	267	102	0,578	5,86	44,0	12,84	30,1	34,5	4,50
11	29	144	267	102	0,578	5,90	44,4	12,92	30,4	21,0	4,47
		12. 5,0 γ k-Strophanthin.									
12	30	144–142–138	267	102	0,578	5,48	41,2	12,00	28,3	30,4	4,82
13	36	136–132–130	267	102	0,578	5,20	39,1	11,38	26,7	36,2	5,08
		14. 20 γ k-Strophanthin.									
14	47	130–126–120	267	102	0,578	5,15	38,7	11,26	26,4	35,2	5,12
15	25	120	267	102	0,578	5,08	38,2	11,12	26,1	19,0	5,19
		16–17. Azetylcholindauerinfusion 120′ = $1{,}9 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.									
16	56	120–118–116	267	102	0,578	4,84	36,4	10,60	24,9	32,6	5,46
17	62	116–114–108	267	102	0,578	4,54	34,1	9,94	23,3	38,0	5,82
		18–20. Insulindauerinfusion 130′ = 0,0074 E/Min.									
18	33	108–106	267	102	0,578	4,44	33,4	9,72	22,8	20,4	5,95
		19. 50 γ k-Strophanthin.									
19	58	106	267	102	0,578	4,14	31,1	9,06	21,3	27,0	6,38
		20. 100 γ k-Strophanthin.									
20	30	112 Extrasystolie	267	102	0,578	4,57	34,4	10,00	23,5	11,0	5,78
		21. Insulindauerinfusion 30′ = 0,15 E/Min.									
21	30	Irregularität	267	102	0,578	5,06	38,0	11,07	26,0	7,5	5,22

0,084 γ/Min. (Tabelle 6, Nr. 2—3) unterhält die Zuckerverbrennung und bewirkt sogar noch ein mäßiges Mehrverschwinden von Zucker aus dem Blute bei einer gleichzeitigen geringen Einschränkung des Sauerstoffverbrauchs, die letztere ist ja bereits früher von uns[2] als die Wirkung kleinster Adrenalinmengen beobachtet und beschrieben worden. Schon bei einer Adrenalinmenge von 0,18 γ Min. (Tabelle 9, Nr. 4) tritt als die erste Wirkung eine Hemmung der Zuckerassimilation ein, da nur 70% des calorischen Sauerstoffäquivalents aus dem Blutzucker gedeckt werden. Der Sauerstoffverbrauch erfährt durch diese Adrenalinmenge noch keine Steigerung. Diese tritt erst bei der nächst größeren Adrenalininfusion von 0.5 γ Min. (Abb. 7 und Tabelle 9, Nr. 5) ein, wo nurmehr

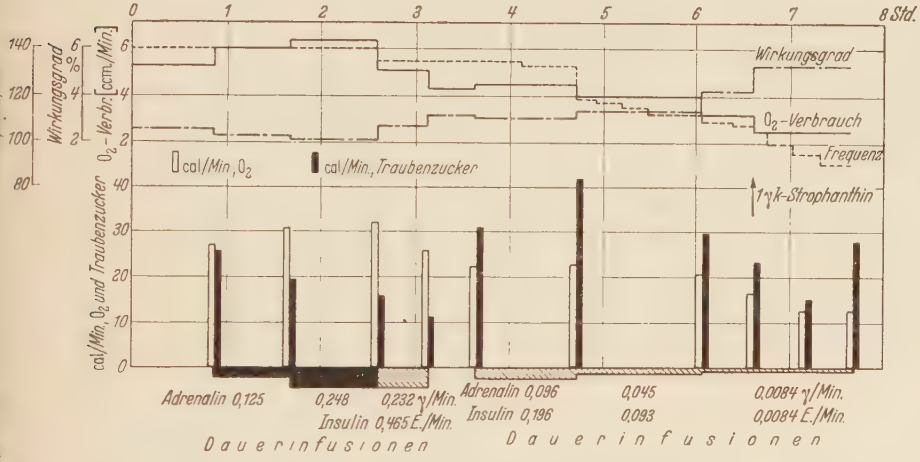


Abb. 8. Versuch Nr. 14 vom 31. V. 38, H. L P., Körpergewicht 7,8 kg, Herzgewicht 60 g.
□ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

44% des Sauerstoffbrennwertes aus dem Blutzucker gedeckt werden. Die weiteren Erhöhungen der Adrenalinmenge haben gleichfalls weitere Verbrennungssteigerungen zur Folge, wobei ungefähr auch nur der gleiche prozentuale Anteil des Brennwertes aus dem Blutzucker gedeckt wird.

Wenn nun zu einer Adrenalinmenge von 0,7 γ Min. 0.0645 E/Min. Insulin infundiert werden (Tabelle 9, Nr. 8), dann wird die Adrenalinwirkung durch den assimilatorischen Insulineffekt aufgehoben. Der Sauerstoffverbrauch ist um 23% niedriger als mit der gleichen Adrenalinmenge im Vorversuch (Tabelle 9, Nr. 6), die Zuckerassimilation übersteigt das calorische Äquivalent des Sauerstoffs um 8.7%. Die folgende Periode mit 0,045 E pro Min. Insulin allein unterhält die geringe Zuckerassimilation.

Ein weiteres Beispiel der Adrenalinwirkung bietet der folgende Versuch Nr. 14 (Abb. 8 und Tabelle 10). In zwei Perioden (Tabelle 10, Nr. 2 und 3) mit 0.125 und 0,248 γ Adrenalin pro Minute sehen wir neben der Steigerung

Tabelle 10.

Datum: 31. V. 38, Versuch Nr. 14, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 7,8 kg, Herzgewicht: 60 g, Präparationsdauer: 17 Min., Versuchsdauer: 8 Std. 50 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	50	142	130	110	0,306	5,31	88,4	11,64	27,3	26,8	2,63
		2. Adrenalindauerinfusion 44′ = 0,125 γ/Min.									
2	49	142	130	110	0,306	5,10	101,6	13,35	31,4	19,8	2,29
		3. Adrenalindauerinfusion 50′ = 0,248 γ/Min.									
3	53	142	130	110	0,306	6.09	101,5	13,34	31,3	26,2	2,29
		4. D. I. 30′ = 0,232 γ Adrenalin + 0,465 E Insulin/Min.									
4	33	136	130	110	0,306	5,15	85,8	11,28	26,5	11,6	2,71
5	28	136	130	110	0,306	4,39	73,1	9,62	22,6	31,1	3,18
		6. D. I. 69′ = 0,096 γ Adrenalin + 0,196 E Insulin/Min.									
6	64	136–134	130	110	0,306	4,61	75,8	10,10	23,7	42,0	3,05
		7. D. I. 70′ = 0,045 γ Adrenalin + 0,093 E Insulin/Min.									
7	74	120–118–116–114	130	110	0,306	4,12	68,6	9,02	21,2	30,3	3,39
		8–9. D. I. 95′ = 0,0084 γ Adrenalin + 0,0084 E Insulin/Min.									
8	32	110–108	130	110	0,306	3,28	54,6	7,19	16,9	23,8	4,26
		9. 1,0 γ k-Strophanthosid.									
9	63 (30)	106–100–96–90	130	110	0,306	2,59	43,1	5,68	13,3	15,1 (28,8)	5,38

des Sauerstoffverbrauchs eine Einschränkung der Zuckerverwertung aus dem Blute, da nur 63 bzw. 50% des calorischen Sauerstoffrestes aus dem Blutzucker gedeckt werden. Die nun folgende zusätzliche Dauerinfusion einer größeren Insulinmenge von 0,465 E/Min. zu 0,238 γ/Min. Adrenalin ergibt während der ersten halben Stunde (Tabelle 10, Nr. 4) eine Einschränkung des Sauerstoffverbrauchs und erst in der Nachperiode (Tabelle 10, Nr. 5) ein über den Sauerstoffbrennwert hinausgehendes Verschwinden von Zucker. Dieses Verhalten weist wiederum auf die langsame Entwicklung der Insulinwirkung hin, es überwiegt daher in der ersten halben Stunde noch die dissimilatorische Adrenalinwirkung. Durch eine Kombination von Adrenalinmengen von 0,096—0,045 –0,008 γ/Min. mit 0,196 –0,093 –0,0084 E Insulin pro Minute wird die Zuckerassimilation ziemlich gesteigert, während die Einschränkung der Verbrennungen mäßig zunimmt. Wir haben in diesem Versuchsabschnitt ein Überwiegen der Insulinwirkung vor uns.

Einen weiteren Beitrag zur Adrenalinwirkung stellt der Versuch Nr. 20 (Abb. 5 und Tabelle 7, s. S. 642) dar. Kleine Adrenalinmengen

(Tabelle 7, Nr. 5) haben auch hier auf die Zuckerverwertung den schon oben erwähnten Einfluß im Sinne einer Assimilationsförderung. Den Antagonismus Insulin—Adrenalin sehen wir aus einem Versuchsabschnitt (Tabelle 7, Nr. 7—11), wo sich bei der alleinigen Insulindauerinfusion eine das calorische Sauerstoffäquivalent überschreitende Blutzuckerabnahme ausbildet, die durch zusätzliche Adrenalindauerinfusionen (Tabelle 7, Nr. 9—11) zwar etwas zurückgedrängt, aber nicht aufgehoben wird und auch den Abschluß der Insulininfusion (Tabelle 7, Nr. 12) noch um 30 Minuten überdauert. Die Adrenalinwirkung kommt wiederum in der Art zum Ausdruck, daß zuerst und ausgesprochen die Zuckerverwertung aus dem Blute stark herabgesetzt wird (Tabelle 7, Nr. 13—14), dagegen ist die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs hier noch sehr gering.

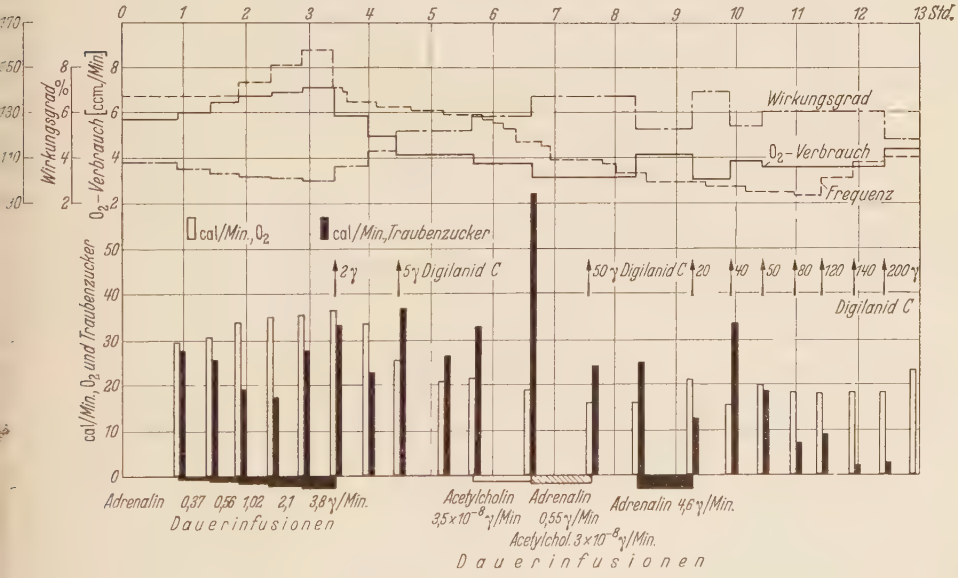


Abb. 9. Versuch Nr. 17 vom 20. X. 38, H. L. P., Körpergewicht 10,3 kg, Herzgewicht 90 g. □ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Sehr instruktiv zeigt auch der Versuch Nr. 17 (Abb. 9 und Tabelle 11, Nr. 1—6) die Hemmung der Zuckerverwertung aus dem Blute bei gleichzeitiger Steigerung der Verbrennungen durch das Adrenalin.

Durch geeignete Kombination von Insulin, Azetylcholin und Adrenalin kann man einen stationären Zustand herbeiführen, bei dem das Kohlehydratäquivalent den Brennwert des Sauerstoffs deckt. Im Versuch Nr. 30 (Abb. 6 und Tabelle 8, Nr. 11—14) haben wir ein Beispiel dieser Art, wo über 4 Stunden ein gleichbleibender Sauerstoff- und Zuckerverbrauch unterhalten wird.

Tabelle 11.

Datum: 20. X. 38, Versuch Nr. 17, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 10,3 kg, Herzgewicht: 90 g, Präparationsdauer: 17 Min., Versuchsdauer: 12 Std. 25 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	51	138	250	100	0,492	5,78	64,2	12,65	29,7	27,9	3,89
		2. Adrenalindauerinfusion 31′ = 0,37 γ/Min.									
2	30	138	250	100	0,492	6,02	67,8	13,20	30,9	26,0	3,63
		3. Adrenalindauerinfusion 30′ = 0,56 γ/Min.									
3	29	138	250	100	0,492	6,64	73,8	14,31	34,1	18,9	3,44
		4. Adrenalindauerinfusion 31′ = 1,02 γ/Min.									
4	30	144	250	100	0,492	6,84	76,0	14,97	35,2	17,5	3,29
		5. Adrenalindauerinfusion 30′ = 2,1 γ/Min.									
5	30	152	250	100	0,492	6,98	77,5	15,29	35,8	28,2	3,22
		6. Adrenalindauerinfusion 30′ = 3,8 γ/Min.									
6	31	158	250	100	0,492	7,03	78,1	15,40	36,1	30,0	3,19
		7. 2 γ Digilanid C.									
7	30	142–140–136	250	100	0,492	5,95	66,0	13,02	30,6	23,1	3,78
8	30	136–134	250	100	0,492	5,05	56,1	11,06	25,9	37,6	4,44
		9. 5 γ Digilanid C.									
9	42	134–132	250	100	0,492	4,21	46,8	9,22	21,6	27,0	5,34
10	29	130–130	250	100	0,492	4,20	46,6	9,20	21,6	33,0	5,35
		11. Azetylcholindauerinfusion 53′ = $3,5 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.									
11	53	130–128–126–124–118	250	100	0,492	3,78	42,0	8,28	19,4	63,2	5,94
		12. D. I. 60′ = 0,55 γ/Min. Adrenalin + $3,0 \cdot 10^{-8}$ γ/Min. Azetylcholin.									
12	59	118–116–110	250	100	0,492	3,22	35,7	7,05	16,5	24,7	6,98
		13. 50 γ/Digilanid C.									
13	42	110–108–104	250	100	0,492	3,26	36,2	7,14	16,8	25,6	6,89
		14. Adrenalindauerinfusion 49′ = 4,60 γ/Min.									
14	53	104–100	250	100	0,492	4,16	46,2	9,11	21,3	12,8	5,40
		15. 20 γ Digilanid C.									
15	36	100–98	250	100	0,492	3,16	35,1	6,92	16,2	33,9	7,11
		16. 40 γ Digilanid C.									
16	30	98–96	250	100	0,492	4,00	44,5	8,76	20,5	19,0	5,61

Tabelle 11 (Fortsetzung).

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
						17. 50 γ Digilanid C.					
17	30	96	250	100	0,492	3,60	40,0	7,89	18,5	17,5	6,22
						18. 80 γ Digilanid C.					
18	29	96–94	250	100	0,492	3,62	40,2	7,93	18,6	9,0	6,19
						19. 120 γ Digilanid C.					
19	30	94–102	250	100	0,492	3,62	40,2	7,93	18,6	2,0	6,19
						20. 140 γ Digilanid C.					
20	28	108	250	100	0,492	3,60	40,0	7,88	18,5	3,0	6,22
						21. 200 γ Digilanid C.					
21	31	112	250	100	0,492	4,54	50,5	9,98	23,3	—	4,92

Besprechung.

Die Erscheinung der abnehmenden Zuckerverwertung aus dem Blute des denervierten Herzens und die ihr sehr ähnliche Adrenalinwirkung weisen darauf hin, daß das Spontanverhalten durch das Überwiegen der peripheren Sympathicusrestfunktion bedingt ist. Wir haben früher zeigen können, daß die als Vorläufer der finalen Spontaninsuffizienz auftretende Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs sich auf die gleiche Ursache zurückführen läßt.

Die „energetische Insuffizienz" — der von uns vorgeschlagene Ausdruck für diesen Vorgang — erfährt nun eine Erweiterung insofern, als die ihr zugrunde liegende Störung des Funktionsgleichgewichts Vagus—Insulin und Sympathicus zum Überwiegen des letzteren führt, dessen erstes Zeichen die zunehmende Unfähigkeit der Zuckerverwertung aus dem Blute darstellt.

Die mangelhafte Fähigkeit der Zuckerverwertung am H. L. P. bei längerer Dauer ist aber durchaus nicht identisch mit einer Unfähigkeit der Zuckerverbrennung. Es liegt doch sehr nahe, daran zu denken, daß die Kohlehydrateigenvorräte des Herzens einen Teil des Energiebedarfs mitdecken.

Wir haben zeigen können, daß man durch größere Adrenalindauerinfusionen eine frühzeitige energetische Insuffizienz hervorrufen kann, die dann von einem dynamischen Herzversagen gefolgt ist. Aus einer Arbeit von C. Lovatt Evans[21], dem wir ja die Kenntnis der Adrenalinwirkung auf den Sauerstoffverbrauch des Herzens verdanken, und seiner Mitarbeiter Boyne und Gregory[22] geht hervor, daß man durch länger-

[21] J. Physiol. (Brit.) **47**, 446 (1914). — [22] Quart. J. exper. Physiol. **27**, 27 (1937).

dauernde Infusionen größerer Adrenalinmengen (4—6 γ/Min. über etwa 2 Stunden) die Glykogenvorräte des Herzens erschöpfen kann mit dem Enderfolg, daß am Schluß oder unmittelbar nach der Infusion ein Herzversagen eintritt.

Wir haben früher[2, 3] schon darauf hingewiesen, daß bei unbeeinflußten H. L. P. nach vier- bis sechsstündiger Dauer und danach eintretender Spontaninsuffizienz Adrenalin und andere sympathicotrope Substanzen oft nicht mehr wirksam sind. Unsere Erklärung für dieses Verhalten war die folgende. Ein Teil der Steuerungswirkung des sympathischen Nervensystems und seines Überträgerstoffes Adrenalin auf die Herzenergetik beruht auf der Mobilisierung der Energiereserven, deren wichtigste im Glykogenvorrat des Herzmuskels besteht. Wenn die assimilatorische Vagus-Insulinwirkung langsam ausfällt, so muß es durch das relative Überwiegen des Sympathicus zu einer zunehmenden Erschöpfung des Glykogenvorrats kommen, die dann die finale Herzinsuffizienz bedingt. Bei dem Mangel an Glykogen bei längerer Dauer des H. L. P. fällt aber damit der Angriffspunkt für das Adrenalin weg.

In diesem Zusammenhang scheint uns eine gemeinsam mit Zinnitz[16] an der Spinalkatze gemachte Beobachtung, die vor uns von Burn schon gemacht wurde, wichtig. Nach längerdauernden Dauerinfusionen von größeren Adrenalinmengen (1—7 γ/Min.) stirbt das Spinaltier ausnahmslos innerhalb einer halben Stunde nach dem Absetzen der Injektion. Wir erklären uns diesen Vorgang in einer Erschöpfung der Vagus-Insulinwirkung, wobei die Verminderung der Glykogenvorräte auch nicht ohne Bedeutung sein dürfte.

Die Abnahme des Zuckerverbrauchs aus dem Blute unter dem Adrenalin am Herzen hat noch eine interessante Parallele am Skeletmuskel. Wie C. F. Cori und G. T. Cori[23] annehmen, ist unter der Adrenalinwirkung der Zuckerverbrauch der Muskulatur aus dem Blute herabgesetzt. Wie aus den Versuchen von Mann und Magath[24] hervorgeht, kann das Muskelglykogen durch Adrenalin nicht für den Gesamtorganismus mobilisiert werden, wohl aber wird es, wie aus den Befunden von Choi[25] zu ersehen ist, unter Adrenalinwirkung im Muskel selbst verbraucht.

Unter Berücksichtigung aller bisher betrachteten Tatsachen scheint uns der Schluß gerechtfertigt, daß der Herz- und Skeletmuskel unter dem dissimilatorischen Sympathicus- bzw. Adrenalineinfluß Eigenglykogen mobilisieren und verbrennen kann.

Die energetische Steuerungswirkung des Sympathicusüberträgers Adrenalin erfährt eine erweiternde Klärung, wenn man die Wirkung kleinster Mengen betrachtet. In Ergänzung früherer Beobachtungen, die eine Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch zeigten, haben wir für kleinste

---

[23] J. biol. Chem. (Am.) **79**, 309 (1928). — [24] Erg. Physiol. usw. **24**, 379 (1925). — [25] Amer. J. Physiol. **83**, 406 (1928).

Adrenalinmengen auch eine assimilatorische Wirkung am Zuckerstoffwechsel feststellen können, die unserer Auffassung nach über eine Verstärkung der Insulinwirkung geht.

Ein direkter Verbrauch von Zucker aus dem Blute durch den Herzmuskel ist nicht möglich, vielmehr muß derselbe erst auf assimilatorischem Wege über das Glykogen für den dissimilatorischen Verbrauch angreifbar gemacht werden. Diese assimilatorische Aufgabe kommt in erster Linie dem Insulin zu, als dessen Hauptwirkung die Glykogensynthese angesehen werden muß. Wir haben in unseren Versuchen am Herzen diese assimilatorische Insulinwirkung in Bestätigung der Versuche anderer Autoren, von denen wir die Versuche von Burn und Dale[18] als die ersten beweisenden angeführt haben, zeigen können. Ein gleichzeitig mit der Zuckerassimilation eintretender Einfluß des Insulins ist eine Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch und bei längerer Zufuhr auch eine Bradycardie. Diese Nebenwirkungen betrachten wir nicht als direkte Insulineinflüsse, sondern als durch einen Vagussynergismus bedingte Wirkungen.

Die enge Koppelung der Insulinwirkung mit der Vagusfunktion hinsichtlich der assimilatorischen Stoffwechselwirkung am Herzen geht mit großer Eindringlichkeit aus der Wirkung des Überträgerstoffes Azetylcholin hervor, wobei die Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch und die Bradycardie als die Vagushauptwirkungen angesehen werden müssen. Die Zuckerassimilation möchten wir der synergistischen Steigerung der Insulinwirkung zuschreiben.

In unseren Versuchen an der Spinalkatze[16] haben wir neben der Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch die gesteigerte Zuckerassimilation unter der Vagusreizung ebenfalls auf eine Insulinwirkung zurückgeführt. Dabei haben wir aber mehr an die von Zunz und La Barre[26] beobachtete Insulinmehrsekretion infolge der Vaguswirkung auf das Pankreas gedacht. Aus unseren jetzigen Versuchen geht hervor, daß die Insulinwirkung auch peripher durch den Vaguseinfluß gesteigert werden kann.

Unsere Beobachtungen bestätigen eine von Ernould[27] gemachte sehr wichtige Feststellung der Wirkung des Azetylcholins auf den Zuckerstoffwechsel. Er fand nämlich an der Muskulatur der Spinalkatze unter der Wirkung des Vagusüberträgerstoffes eine deutliche Glykogenanreicherung. Durch die Untersuchung korrespondierender Muskeln nach der Methode von Best, Dale, Hoet und Marks[28] ist die Fehlerquelle, die in dem unterschiedlichen Glykogengehalt verschiedener Muskeln liegt, ausgeschaltet. Die gleiche Wirkung wurde von ihm auch am pankreaslosen

[26] C. r. Soc. Biol. **96**, 421, 708 (1927). — [27] Ebenda **108**, 434 (1931). — [28] Proc. roy. Soc., Lond., Ser. B: Biol. Sci. **100**, 55 (1926).

Spinaltier gefunden, so daß in diesem Falle eine Insulinmehrsekretion nicht die Hauptursache der Glykogenspeicherung sein kann.

Dieser Einfluß des Vagus bzw. seines Überträgerstoffes gewinnt noch eine ganz besondere Bedeutung, wenn man ihn zur Erklärung der Glykogensynthese in der Muskulatur des pankreasdiabetischen Tieres heranzieht. Wie Chaikoff[29] gezeigt hat, findet beim pankreasdiabetischen Hund in den ersten Tagen noch eine Glykogenablagerung in der Muskulatur statt. Macleod[30] weist darauf hin, daß für diesen Vorgang noch keine Erklärung zu finden sei.

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß der Vagusüberträgerstoff die Insulinwirkung verstärken kann, wie auch andererseits eine Insulinwirkung ohne Vaguseinfluß auf die Dauer nicht möglich ist.

Man darf wohl annehmen, daß nach der Pankreasexstirpation noch ein gewisser Insulinvorrat im Organismus vorhanden ist, dessen Wirksamkeit durch eine gesteigerte Vaguswirkung erhöht werden kann, so daß an der Muskulatur die Zuckerverwertung über das Glykogen für eine kurze Zeit ohne Insulinneuproduktion auf dem Wege der Wirkungsverstärkung des vorhandenen durch den Vagus möglich ist.

Wenn man die von uns am Herzen gemachten Beobachtungen auf eine kurze Formel zu bringen versucht, so könnte man sie folgendermaßen fassen: Die gekoppelte Vagus-Insulinwirkung schafft durch die Glykogensynthese erst die Voraussetzung der durch die Sympathicus- bzw. Adrenalinwirkung gesteuerten Zuckerverbrennung in der Herzmuskulatur.

Wir haben oben schon darauf hingewiesen, daß eine Vergleichbarkeit von Beobachtungen an isolierten Herzen nur dann möglich ist, wenn die Funktionslage, die sich aus dem Verhältnis der vegetativen Restfunktionen ergibt, eine ähnliche ist. Bei Einhaltung derselben Versuchsbedingungen, wobei nach unserer Auffassung die Schnelligkeit und Gleichmäßigkeit der Präparation das im wesentlichen ausschlaggebende Moment ist, bekommt man mit Sicherheit vergleichbare Bedingungen. Die Lebensdauer eines Präparats ist das beste Kriterium für gute Grundbedingungen. Herz-Lungenpräparate mit einer geringeren Lebensdauer als 5 Stunden können für solche Untersuchungen, wie wir sie durchgeführt haben, nur als unbrauchbar bezeichnet werden. Gollwitzer-Meier und Krüger[9] sind scheinbar der gegenteiligen Ansicht, denn sie schreiben wörtlich: „Energetische Messungen, die mit der internen Methode an Präparaten gewonnen sind, die 12—14 Stunden (Gremels) überleben, können daher nach unserer Auffassung keinen Anspruch auf Zuverlässigkeit erheben." Das „daher" bezieht sich aber auf das Lungenödem, das angeblich meine Untersuchungen unzuverlässig macht. Ehe man den Vorwurf der Unzuverlässigkeit erhebt, muß man erst einmal beweisen, daß man es besser kann. Als Voraussetzung eines solchen Urteils muß die Leistung gefordert werden, an gleichlang dauernden Präparaten wie den unseren den Nachweis der Fehler zu erbringen. In den Arbeiten von Gollwitzer-Meier und Mitarbeitern aber finden sich keine Angaben über die Lebensdauer ihrer Präparate.

[29] J. biol. Chem. (Am.) **74**, 203 (1927). — [30] Lectures on the Physiology of Glycogen, Lancet 1929.

Wenn man sich nun um die Gegenprobe bemüht, so fällt es nicht schwer, wie ich an anderer Stelle gezeigt habe, aus Arbeiten von Gollwitzer-Meier und Mitarbeitern[13] am H.L.P. an Hand von ihren eigenen Zahlen zu beweisen, daß bei diesen Versuchen sehr unzulängliche Bedingungen vorgelegen haben müssen.

Wenn Gollwitzer-Meier und Krüger aus ihren Versuchen, in denen nach 2 Stunden Lungenödem eintrat, schließen, daß dies eine allgemeine Gesetzmäßigkeit sei, so ist das gleichfalls ein Irrtum. In meinen Versuchen habe ich bis zu 20 Stunden lungenödemfreie Präparate gehabt. Ich bin vielmehr der Ansicht, daß die H.L.P. von Gollwitzer-Meier nicht besonders gut sind, denn ein schon nach 2 Stunden eintretendes Lungenödem ist nach unserer Erfahrung ein Zeichen für ein schlechtes Präparat. Doch auch aus anderen Versuchen von Gollwitzer-Meier und Mitarbeitern[31], in denen die spezifische Stoffwechselwirkung des Adrenalins gezeigt werden sollte, läßt sich aus der Adrenalinreaktion sagen, daß diese Herzen allesamt schon dynamisch insuffizient waren, denn bei allen trat unter dem Adrenalin eine Minutenvolumenvermehrung ein, die unter diesen Umständen der Beweis einer Herzinsuffizienz ist. Ich bin daher der Auffassung, daß Gollwitzer-Meier sich lieber um Verbesserungen der eigenen präparativen Methodik bemühen sollte, anstatt mit unzureichenden Mitteln kritische Betrachtungen über den Wert unserer Arbeiten anzustellen.

Man kann, wie wir zeigen konnten, durch geeignete kombinierte Dauerinfusionen von Azetylcholin-Insulin und Adrenalin für beliebig lange Dauer einen stationären Zustand schaffen, der den Normalbedingungen annähernd entsprechen dürfte, wo die Kohlehydratverbrennungen aus dem Blutzucker unterhalten werden.

Es ergibt sich aus der vergleichenden Betrachtung unserer bisher angeführten Beobachtungen, daß eine antagonistische Beeinflussung zwischen Vagus-Insulin einerseits und Adrenalin andererseits besteht. Allerdings handelt es sich dabei nicht um ein regelrechtes Gleichgewicht, sondern die Vagus-Insulinwirkung setzt eine bestimmte Adrenalinwirkung viel stärker herab.

Schon die zeitlichen Faktoren der Entwicklung solcher Zustände weisen darauf hin, daß der Charakter der Zustandsänderung der Funktionslage bei Vagus und Sympathicus verschieden ist. Die Sympathicusreaktionen treten momentan ein, wie dies ihrer Aufgabe der dissimilatorischen Steuerung entspricht. Ein Teil der physiologischen Vaguswirkungen entwickelt sich im Gegensatz zu den Sympathicuseinflüssen sehr langsam, dahingegen wird aber der einmal erreichte Zustand auch viel fester gehalten. Dies gilt insbesondere für die Beeinflussung von Stoffwechselvorgängen. Das gleiche Verhalten ergibt sich aus der Sauerstoffsparwirkung des Vagusüberträgerstoffes am Herzen[2]. Für das Insulin ist ja die langsam entstehende und lang anhaltende Wirkung ebenfalls charakteristisch.

Gollwitzer-Meier und Krüger[13] haben in ihrer Untersuchung über den Einfluß der Herznerven auf den Gaswechsel momentan entstehende Vagusstoffwechselwirkungen die ebenso schnell wieder verschwinden, beobachtet. In einem Teil der Versuche wurde durch elektrische Vagus-

[31] Pflügers Arch. **237**, 639 (1936).

Tabelle (nach Werten von Tab. 2, Gollwitzer-Meier und Krüger).

Reiz-intensität	Reizdauer	Differenz		Frequenz	Sauerstoff-verbrauch
		Minuten-volumen	Coronar-volumen		
mA	Sek.	%	%	%	%
0,15	40	— 13	+ 4	— 40	— 22
0,30	40	— 34	— 32	— 55	— 50
0,75	60	— 25	— 7	— 79	— 59

reize von kurzer Dauer eine Wirkung zu erreichen versucht. Aus den Zahlen (in Tabelle 2 der Arbeit) geht hervor, daß die Reize eine sehr starke Wirkung hatten. Nimmt man die Zahlen zu Hilfe, dann findet man in fast allen Fällen ausgesprochene Senkungen des Minutenvolumens, eine erhebliche Frequenzherabsetzung, eine wechselnde Abnahme der Coronardurchblutung und zum Teil sehr erhebliche Sauerstoffverbrauchssenkungen, wie aus der vorstehenden Tabelle zu ersehen ist. Nach der eigenen Angabe der Autoren sind auch gleichzeitig Herzdilatationen eingetreten. Die Voraussetzung für die Sauerstoffmessungen in diesen Versuchen ist die Kenntnis der genauen Größe der Coronarzirkulation. Wie wir aus den Untersuchungen von Anrep[32] und Rein[33] wissen, ist der Vagus der konstriktorische Nerv der Coronarien. In einem der vorliegenden Versuche ist unter einer Vagusreizung trotz der Aortendrucksenkung um 20 mm Hg (Abb. 3, Gollwitzer-Meier und Krüger[13]) eine Zunahme des Coronarvolumens zu verzeichnen. In der Tabelle 2 sind leider keine Blutdruckzahlen angegeben, aber auch da müssen ja entsprechend der Herabsetzung des Minutenvolumens Blutdrucksenkungen vorhanden gewesen sein. Auch hier liegt in einem Falle eine Steigerung der Coronardurchblutung vor und nur in einem einzigen eine ausgesprochene Senkung. Schon allein aus den mit den Vagusreizungen durch Minutenvolumenabnahme bedingten Blutdrucksenkungen müßte eine Herabsetzung des Coronarvolumens resultieren. Da dies nur in einigen Versuchen der Fall ist, müßte bei den anderen eine aktive Coronarerweiterung oder eine passive bedingt durch eine Verminderung der Anrepschen systolischen Einflußhemmung infolge der negativ inotropen Vaguswirkung angenommen werden. Die uneinheitliche Reaktion der Coronardurchblutung bei den elektrischen Vagusreizungen muß als eine Folge der zu starken Reize angesehen werden. In den Untersuchungen von Gremels und Zinnitz[16] über die nervöse Stoffwechselsteuerung an der Spinalkatze wurde neben der Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch und einer Steigerung der Zuckerassimilation als Folge einer Vagusreizung mit Intensitäten von 0,1—0,1 Milliamp. das Gegenteil beobachtet, wenn höhere Reizintensitäten um 1,5 Milliamp. und mehr angewandt wurden. Es kam dann zu erheblichen Blutzuckersteigerungen, die als eine Folge von Glykogenmobilisierungen gedeutet wurden und zu

[32] Heart **13**, 239 (1926). — [33] Z. Biol. **92**, 101 (1932).

Erhöhungen des vorher herabgesetzten Sauerstoffverbrauchs. Wir haben zur Erklärung dieser Beobachtungen die folgende Annahme gemacht: Die im Vagosympathicus verlaufenden Sympathicusfasern werden erst durch höhere Intensitäten zur Bildung dissimilatorisch wirksamer Überträgerstoffmengen gereizt, die dann die ihnen zugeordneten Stoffwechselwirkungen hervorrufen. Rein und Schneider haben auf der Basis der auch von ihnen festgestellten verschiedenen Erregbarkeit von Vagus- und Sympathicusfasern eine Methode der selektiven Reizung mit Wechselströmen bestimmter Frequenz und Intensität entwickelt. Wir gehen nicht fehl, wenn wir die Erweiterungen oder verhältnismäßig geringen Verengerungen der Coronarien in den vorliegenden Versuchen als eine Sympathicusreizerscheinung auffassen. Die unter diesen Umständen festgestellten Sauerstoffverbrauchswerte können daher keinen Anspruch machen, als Wirkungen einer Vagusreizung angesehen zu werden.

Bei den starken Frequenzherabsetzungen (z. B. von 128 auf 27 pro Minute) findet sich keine Angabe, ob gleichzeitig eine Irregularität vorhanden war, wohl ist eine solche aus der Aortendruckkurve (Abb. 2, Gollwitzer-Meier und Krüger[13]) abzulesen. Reguläre Pulsverlangsamungen von den Ausmaßen, wie sie in der besprochenen Arbeit vorkommen, sind durch elektrische Vagusreizungen nicht zu erzielen, da bei den dazu angewandten Reizintensitäten bereits auch Überleitungsstörungen auftreten.

Die durch elektrische Vagusreizung von so kurzer Dauer gewonnenen Sauerstoffverbrauchssenkungen können nicht als spezifische Vagusstoffwechselwirkungen angesehen werden. Allein schon die gleichzeitige Minutenvolumenherabsetzung macht die Feststellung der spezifischen Wirkung unmöglich. Ebenso ist die an einem dilatierten und irregulären Herzen gemachte Beobachtung von 40–60 Sekunden gleichfalls nicht geeignet, die zuerst von uns in früheren Arbeiten[2] festgestellte spezifische O_2-Sparwirkung des Vagus bzw. seines Überträgerstoffes Azetylcholin zu bestätigen.

Man kann an einem anderen Versuch der Autoren (Abb. 4, Gollwitzer-Meier und Krüger[13]) sehen, daß eine physiologische Steigerung der Vaguswirkung, die durch Erhöhung des Blutdrucks im Kopfkreislauf des innervierten H. L. P. hervorgerufen wird, eine geringe Abnahme des Coronarvolumens, eine starke Frequenzverlangsamung, eine mäßige Abnahme des Minutenvolumens und „eine unsichere spezifische Wirkung auf den Herzgaswechsel" hat. Unserer Meinung nach war die Vagusreizperiode auch in diesem Versuch zu kurz, um die spezifische Stoffwechselwirkung zum Durchbruch kommen zu lassen.

Gollwitzer-Meier und Krüger[13] nehmen nun Veranlassung, aus den Vagusreizversuchen mit Herzdilatation und Sauerstoffverbrauchsverminderung zu schließen: „Das Gesetz der Herzarbeit (Starling) besitzt unter dem Vaguseinfluß keine Gültigkeit."

Starling und Visscher[14] hatten unter ihren Versuchsbedingungen am H. L. P. als die einzige klare Beziehung den Sauerstoffverbrauch als eine Funktion des diastolischen Herzvolumens festgestellt. Hierdurch erfuhr das Frank-Starlingsche Gesetz* der Herzarbeit eine Erweiterung, insofern als nicht nur die mechanische Arbeitsleistung eine Funktion des diastolischen Volumens ist, sondern auch die Energieumwandlungen gleichfalls dadurch bestimmt werden, indem die Vergrößerung der chemisch aktiven Oberflächen entsprechende Verbrennungssteigerungen ermöglicht.

Wir[1] haben in unserer ersten Energetikarbeit diese Gesetzmäßigkeit für die Volumenarbeitsleistung des Herzens bestätigt gefunden. Hinsichtlich der Energieumwandlungen fanden wir, daß mit zunehmendem Minutenvolumen bei gleichbleibendem Aortendruck die Sauerstoffverbrauchszunahme im wachsenden Maße kleiner wird, d. h. einer Exponentialfunktion entspricht. Der Wirkungsgrad ist demnach eine lineare Funktion der Herzarbeit im Verhältnis 0,6 : 1.

Peters und Visscher[15] haben in ihren Untersuchungen am H. L. P. gefunden, daß beim versagenden Herzen und konstanten diastolischen Volumen, wie es durch Drosselung des Blutangebotes erreicht werden kann, der Sauerstoffverbrauch unverändert bleibt, d. h. eng an das diastolische Volumen geknüpft ist. Es gilt also auch für das insuffiziente Herz dieselbe Gesetzmäßigkeit wie für das normale leistungsfähige, nur mit kleineren Wirkungsgraden.

Wie wir[1] zuerst gezeigt haben, gibt es aber Sauerstoffverbrauchssteigerungen ohne Herzvolumenzunahme unter der Wirkung kleiner Adrenalinmengen.

Bei unseren Versuchen haben wir keine direkten cardiometrischen Messungen angestellt, sondern den Druck im rechten Vorhof als Kriterium genommen. Bei vollkommener Konstanz von Minutenvolumen und der Lungenstrombahn ist der Vorhofsdruck als Maß der dynamischen Leistungsfähigkeit, die ja durch die diastolische Faserlänge gegeben ist, durchaus zuverlässig. Dasselbe gilt natürlich auch für das linke Herz. Da am H. L. P. das rechte Herz fast immer zuerst dynamisch insuffizient wird, so ist der rechte Vorhofsdruck der empfindlichere Indikator für Änderungen des dynamischen Leistungszustandes des Herzens. Ein unter diesen Umständen über viele Stunden konstanter Vorhofsdruck ist mit einer Konstanz der Leistungsfähigkeit und des sie bedingenden diastolischen Volumens verbunden.

Der Grund, warum wir die für die Beurteilung des Herzens so wichtige Messung des diastolischen Volumens nicht durchgeführt haben, liegt in der Tatsache begründet, daß ein Cardiometer, auch wenn es noch so sorgfältig und geschickt angelegt wird, bei langen Versuchen das Herz beeinträchtigt und schädigt. Das gilt von dem Einführen der Morawitzkanüle in den Coronarsinus in noch höherem Grade. Diese Manipulation erfordert eine sehr geschickte Hand, wenn sie das Herz möglichst

* Nach einer Verständigung mit E. A. Müller möchten wir vorschlagen, in Zukunft das Gesetz so zu benennen, weil zuerst von O. Frank am Kaltblüterherzen die gesetzmäßigen Zusammenhänge von Faserlänge und Arbeitsleistung des Herzens erkannt wurden. E. H. Starling hat uns gegenüber immer wieder betont, daß er auf Grund dieser Befunde diese Beziehungen am Warmblüterherzen untersucht und auch für dieses gültig befunden hat.

schonen will. Bei längerem Liegen ist eine Beeinträchtigung trotzdem nicht zu vermeiden. Ein ähnlicher Einwand gilt für das Einbinden einer Anrep-Stolnikov-Stromuhr in die Arteria pulmonalis. Wir hatten von vornherein die Absicht, das Herz möglichst lange in leistungsfähigem Zustand zu erhalten, um vergleichende Messungen an ein und demselben Präparat anstellen zu können. Für diesen Zweck muß man deshalb mit einem Minimum an Eingriffen auszukommen suchen. Die Ergebnisse unserer Arbeiten[1,2,3] rechtfertigen unsere Stellungnahme in dieser Hinsicht. Die Kritik der eben angeführten Methoden betrifft nur den Zweck ihrer Anwendung für einen speziellen Fall, für die Untersuchung entsprechender Fragen kann ihr Wert keinem Zweifel unterliegen, wie die zahlreichen mit ihrer Hilfe gefundenen Gesetzmäßigkeiten beweisen.

Wir haben[2] nun an Hand der Überträgerstoffwirkungen zeigen können, daß am Herzen eine vegetative Stoffwechselsteuerung vorliegt. Man sieht, daß für ein bestimmtes Minutenvolumen und das ihm zugeordnete Herzvolumen ohne eine Änderung beider durch geeignete Vagus- bzw. Sypathicusstoffwirkungen eine Herabsetzung bzw. Steigerung der Verbrennungen erreicht werden kann.

In unserer ersten Energetikarbeit[1] haben wir gesehen, daß eine Steigerung der Herzarbeitsleistung durch Erhöhung des Aortendrucks bei gleichbleibendem Minutenvolumen mit einer sehr viel stärkeren Sauerstoffverbrauchssteigerung verbunden ist, als die gleiche Mehrarbeit durch Minutenvolumenvermehrung bei gleichbleibendem Aortendruck. Die Zunahme des Herzvolumens — wir nahmen als Maß den Vorhofsdruck — ist bei der Aortendruckerhöhung bis 150 mm Hg nahezu Null und nimmt von da bis 195 mm Hg nur wenig zu, während bei den Minutenvolumenzunahmen das Herzvolumen eine deutliche Vermehrung erfuhr.

E. A. Müller[34,35,36] hat in sehr schönen Arbeiten die Beziehungen des Herzvolumens zu den einzelnen Faktoren der Herzarbeit und Herzleistungsfähigkeit untersucht. Bei Aortendrucksteigerungen findet er Werte vom Quotienten $\frac{\text{Herzvolumenzunahme}}{\text{Drucksteigerung}} = \frac{\Delta V}{\Delta P}$ von 0,05—0,10 bei guten Herzen und 0,1—0,7 bei solchen mit zunehmender Insuffizienz. Wenn er den Quotienten diastolische Ventrikelvolumenzunahme zu den Vorhofsdrucksteigerungen bestimmt, so erhält er für die Aortendruckzunahme den Quotienten 10,0 und für die Minutenvolumenvermehrung 1,5. Dies ist auch in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen. E. A. Müller äußert die Vermutung, daß unter vollkommenen physiologischen Verhältnissen $\Delta V : \Delta P$ gleich Null sei. Danach kann man mit diesem Quotienten sich ein klares Bild über die dynamische Leistungsfähigkeit des Herzens verschaffen. Wir möchten dieser Annahme durchaus zustimmen. Seine Schlußfolgerung, daß für diesen Fall das Frank-Starlingsche Gesetz keine Geltung mehr hat, ist vom dynamischen Standpunkt voll-

[34] Pflügers Arch. **238**, 638 (1937). — [35] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 492 (1937). — [36] Pflügers Arch. **241**, 427 (1938).

kommen richtig. Die Erklärung für dieses Verhalten findet man aber unter Hinzuziehung der energetischen Betrachtungsweise.

Die Tatsache der nervösen Stoffwechselsteuerung erweitert daher nach unserer Ansicht die Gültigkeit des Frank-Starlingschen Gesetzes der Herzarbeit im folgenden Sinne: Für jedes Schlagvolumen besteht ein bestimmtes diastolisches Herzvolumen, dem eine in einer bestimmten Breite variable Verbrennungsenergie zugeordnet ist, deren Verfügung durch die vegetativ-nervöse Stoffwechselsteuerung reguliert wird.

Wir möchten deshalb vorschlagen, von einer dynamischen und energetischen Kraftreserve des Herzens zu sprechen. Die dynamische Kraftreserve wird durch die Faktoren des Herzvolumens und der Frequenz dargestellt. Der Aufbau der energetischen Kraftreserve erfolgt unter dem assimilatorischen Vagus-Insulineinfluß, während die Steuerung des energieliefernden Abbaus der Sympathicus-Adrenalinwirkung unterliegt. Der Einsatz der beiden Reservekräfte des Herzens zeigt eine enge Bindung. Dabei kann der Anteil der einzelnen Reservekräfte allerdings sehr unterschiedlich sein. Bei der physiologischen Arbeitsvermehrung des Herzens durch Minutenvolumenzunahme wird vorwiegend die dynamische Kraftreserve beansprucht, wobei mit zunehmendem Training die Frequenzvermehrung die geringere Steigerung erfährt. Von diesem Gesichtspunkt aus wird die von uns[1,2] früher beobachtete größere Ökonomie dieser Art der Herzarbeit verständlich. Bei der Herzbelastung durch Aortendrucksteigerung, die unter normalen Umständen immer vorübergehender Natur ist, wird fast allein die energetische Kraftreserve beansprucht. Das Anteilverhältnis der beiden Reservekräfte erfährt dagegen unter pathologischen Bedingungen starke Änderungen. So wird am insuffizienten Herzen bei Aortendrucksteigerung auch die dynamische Kraftreserve des Herzvolumens in Anspruch genommen, dieser Vorgang wächst mit zunehmender Insuffizienz. Eine alleinige Mobilisierung der energetischen Kraftreserve finden wir bei der energetischen Insuffizienz, d. h. im Initialstadium jeder Herzinsuffizienz.

Der Einfluß von Digitalisglykosiden und Sympatol auf den Kohlehydratstoffwechsel.

Die Analyse der Digitaliswirkungen auf die Herzenergetik ist zuerst von uns[1] am H. L. P. durchgeführt worden. Wir konnten zeigen, daß eine Sparwirkung auf den anormal hohen Sauerstoffverbrauch beim dynamisch insuffizienten Herzen den ersten Einfluß darstellt. Die weitere Aufklärung dieser Wirkung brachten unsere Untersuchungen[2] über die Steuerung der Energieumsetzungen durch das negative Nervensystem, bei der dem Vagus die Rolle der Assimilationsförderung und dem Sympathicus die der Steuerung der Dissimilationsvorgänge zukommt. Auch Rein[37] kommt

[37] Sitzungsber. Ges. Naturwiss. u. Med. Göttingen 1938.

in seinen Untersuchungen am H. L. P. zu ähnlichen Ergebnissen. Die Vaguswirkung der Digitalisglykoside besteht in einer Änderung der peripheren Wirkungsbedingungen für den Überträgerstoff Azetylcholin. Durch eine mäßige Abdichtung der Zellgrenzflächen wird nach unserer Auffassung das Konzentrationsgefälle des Vagusüberträgerstoffes steiler, was eine Steigerung der Wirkungsintensität für die gleiche Überträgerstoffmenge zur Folge hat. Schon die Herabsetzung der Vaguswirkung, wie sie entweder experimentell durch Vagusdurchschneidung und eine Verminderung der Überträgerstoffbildung oder aber durch eine Potentialbedingungsänderung und Wirkungsabschwächung infolge Herzmuskelschädigung bei normaler Überträgerstoffbildung zustande kommen kann, bedingt einen Sauerstoffmehrverbrauch beim dynamisch noch normal arbeitenden Herzen, den wir als „energetische Insuffizienz" bezeichnet haben. Mit therapeutischen Digitalisdosen, wie sie beim herzkranken Menschen angewandt werden, kann man am H. L. P. nach unseren Beobachtungen diesen Zustand beseitigen. Die starke Sensibilisierung des Herzmuskels für den Vagusüberträgerstoff ist die Grundlage dieser einen Hauptwirkung der Digitalisglykoside.

Inzwischer haben in einer bereits obenerwähnten Arbeit Peters und Visscher[15] den Einfluß von Digitalisglykosiden auf die Herzenergetik untersucht. Sie haben entweder die eintretende Spontaninsuffizienz abgewartet oder aber das Herz durch Alkoholinjektionen mit und ohne Calciumzusatz geschädigt. Ihrem Zweck entsprechend haben sie vor und nach der Gabe von Digitaloiden, sie gebrauchen Scillaren, Scillaren B (Quabain), Strophanthin und Digilanid, das diastolische Volumen konstant gehalten, was durch die Herabsetzung des Minutenvolumens bei der Insuffizienz und durch seine Vermehrung bei der Wiederherstellung der Herzleistung unter der therapeutischen Digitaloidwirkung erreicht wurde. Der wesentlichste Digitaliseinfluß besteht nach ihren Beobachtungen in der Wiederherstellung der dynamischen Leistungsfähigkeit des Herzmuskels und einer Verbesserung des Wirkungsgrades der Herzarbeit. An unseren ersten energetischen Digitalisversuchen[1] beanstanden sie, daß wir ohne Herzvolumenregistrierung keine Bezugsmöglichkeit für unsere Sauerstoffwerte hätten. Dieser Einspruch hat sich durch unsere späteren Beobachtungen über die vegetativ-hormonale Stoffwechselsteuerung am Herzen bereits erledigt.

Die zur Konstanthaltung des diastolischen Volumens notwendigen Minutenvolumenänderungen müssen für die quantitative Feststellung der Wirkungsgradverbesserungen unter dem Glykosideinfluß berücksichtigt werden. So geben sie (Tabelle 6, Versuch 6. III. 33)[15] eine Erhöhung des Wirkungsgrades um 112% nach 125 γ Scillaren B an. Das Minutenvolumen wird zur Konstanthaltung des diastolischen Volumens von 739 ccm Min. im Insuffizienzstadium auf 1428 ccm Min. im therapeutischen Scillarenstadium erhöht, die zugeordneten Sauerstoffwerte betragen 7.2

und 10,0 ccm/Min., denen die Wirkungsgrade von 7,56 und 16,00 % entsprechen. Zum Zwecke eines Vergleichs muß die von uns gefundene Gesetzmäßigkeit der Wirkungsgraderhöhung bei Minutenvolumensteigerung in Anschlag gebracht werden. Für die Volumenarbeit von 1,600 kgm/Min. (739 ccm/Min.) beträgt nach unseren Versuchen der Wirkungsgrad am denervierten Herzen 10,5 %, liegt also höher als bei der vorliegenden Insuffizienz mit 7,56 %, und beim innervierten 18 %. Für die Arbeit von 3.500 kgm/Min. (1428 ccm/Min.) wurde ein Nutzeffekt von 16 % gefunden, während unsere entsprechenden Werte (denerviert) 18 % und (innerviert) 25 % betragen. Danach hat das Glykosid die Herzinsuffizienz aufgehoben und den energetischen Normalzustand des denervierten Herzens wiederhergestellt, wenn man die Fehlergrenze von 20 % für den Vergleich von O_2-Werten verschiedener Herzen zugrunde legt. Dieser Befund stimmt mit einer unserer ersten Beobachtungen* der energetischen Landiginwirkungen überein. Wir haben die Vergleichswerte der Wirkungsgrade unseren Diagrammen, die die Beziehung Wirkungsgrad : Volumenarbeit des Hundeherzens darstellen, entnommen. Die Übereinstimmung unserer Nutzeffektswerte mit denen der amerikanischen Autoren ist doch sehr befriedigend und ein Beweis dafür, daß die Sauerstoffwerte der spirometrischen Methode, wie sie an verschiedenen Herzen und von verschiedenen Untersuchern gefunden wurden, von großer Zuverlässigkeit sind. Die Autoren geben an, daß sie ihre Beobachtungen in der Periode vor dem Eintritt von Irregularitäten, d. h. noch in der therapeutischen Phase, gemacht haben. Nach unseren Beobachtungen[3] kommt es in der toxischen Phase der Digitaliswirkung zu Sauerstoffverbrauchssteigerungen und entsprechenden Herabsetzungen des Wirkungsgrades, die die Feststellung der therapeutisch-optimalen Wirkung bei zu großen Digitalisdosen erschweren.

Im vorangehenden Kapitel haben wir den Einfluß der vegetativ-hormonalen Steuerung unter Einbeziehung des Kohlehydratstoffwechsels betrachtet. Wenn wir uns nun die Digitaliswirkung unter den gleichen Gesichtspunkten anschauen, so sehen wir aus dem nebenstehenden Versuch Nr. 16 (Abb. 10, Tabelle 12), daß nach einer Vorperiode von 1 Stunde, in welcher der Sauerstoff- und Zuckerverbrauch äquivalent sind, durch 1,0 γ k-Strophanthin eine Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch und ein Mehrverschwinden von Zucker bewirkt wird. Die assimilatorisch verschwundene Zuckermenge übersteigt das calorische Sauerstoffäquivalent um 47 %. Diese Wirkung hält über 1 Stunde an. Die erneute Gabe von 1,0 γ k-Strophanthin ruft eine weitere Einschränkung des O_2-Verbrauchs um 23 % gegenüber dem Ausgangswert hervor, hingegen nimmt der Zuckerverbrauch aus dem Blute bis auf eine geringe Spur ab, ein Verhalten, das wir zwar selten als die erste Wirkung auch kleiner Glykosiddosen beob-

* Naunyn-Schmiedebergs Arch. **169**, 689 (1933), Abb. 14 u. 15.

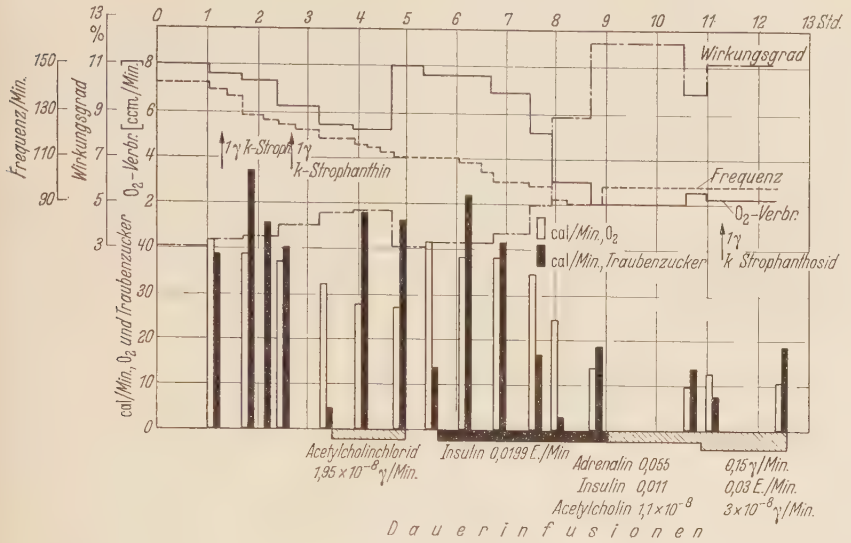


Abb. 10. Versuch Nr. 16 vom 20. VI. 38. H. L. P., Körpergewicht 9,8 kg, Herzgewicht 93 g.
□ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Tabelle 12.

Datum: 20. VI. 38, Versuch Nr. 16, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 9,8 kg, Herzgewicht: 93 g. Präparationsdauer: 14 Min., Versuchsdauer: 13 Stunden.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	42	144	275	105	0,568	8,18	88,0	17,91	42,0	40,8	3,17
2	28	144	275	105	0,568	8,08	87,0	17,70	41,5	39,8	3,21
		3. 1,0 γ Strophanthin.									
3	40	142–138–138	275	105	0,568	7,69	82,7	16,95	39,5	57,0	3,35
4	42 (20)	134–130–128	275	105	0,568	7,38	79,4	16,17	37,9	46,5 39,0	3,51
		5. 1,0 γ Strophanthin.									
5	47	126–124–124	275	105	0,568	6,28	67,5	13,75	32,3	4,5	4,13
		6–7. Azetylcholindauerinfusion 90′ = $1{,}95 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.									
6	43	122–120	275	105	0,568	5,50	59,1	12,05	28,2	48,0	4,71
7	44	118–116–114	275	105	0,568	5,37	52,8	11,76	27,6	46,5	4,83
8	36	114–112	275	105	0,568	8,05	86,8	17,64	41,3	15,0	3,22

Tabelle 12 (Fortsetzung).

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
		9–13. Insulindauerinfusion 203′ = 0,0199 E/Min.									
9	38	114	275	105	0,568	7,67	82,5	16,80	39,4	52,0	3,38
10	40	110–106	275	105	0,568	7,62	81,9	16,70	39,1	42,0	3,40
11	44	102	275	105	0,568	6,82	73,3	14,94	35,0	20,3	3,80
12	26	102–100	275	105	0,568	5,03	54,1	11,02	25,7	3,0	5,15
13	44	94–92–92	275	105	0,568	2,88	31,0	6,30	14,80	19,0	9,03
		14. D. I. 87′ = 0,055 γ Adrenalin + 1,1 · 10^{-8} γ Azetylcholin + 0,011 E Insulin/Min.									
14	89	92–100–100	275	105	0,568	2,08	22,4	4,55	10,67	13,5	12,50
		15–16. D. I. 84′ = 0,15 γ Adrenalin + 3,0 · 10^{-8} γ Azetylcholin + 0,03 E Insulin/Min.									
15	26	100	275	105	0,568	2,54	27,3	5,56	13,1	7,5	10,22
		16. 1,0 γ k-Strophanthosid.									
16	56	100	275	105	0,568	2,25	24,2	4,93	11,56	19,6	11,52

achten konnten (z. B. Versuch Nr. 2, Abb. 3, Tabelle 5, Nr. 7; Versuch Nr. 17, Abb. 9, Tabelle 11, Nr. 7; Versuch Nr. 4, Tabelle 18, Nr. 2). Wir werden weiter unten diesen Vorgang zu erklären versuchen. Eine nun folgende Azetylcholindauerinfusion einer an sich unterschwelligen Menge von 1,9 · 10^{-8} γ/Min. bringt eine deutliche Wirkungssteigerung in Form einer Verminderung des Sauerstoffverbrauchs um 34% und eine Zuckerassimilation von 41% über die verbrannte Menge (Tabelle 12, Nr. 6—7) hervor. In der Nachperiode (Tabelle 12, Nr. 8) kommt die energetische Insuffizienz wieder zum Durchbruch, wie dies aus der Verbrennungssteigerung und der Abnahme des Zuckerverbrauchs aus dem Blute ersichtlich wird. Eine Insulindauerinfusion über 203 Minuten von 0,0199 E pro Min. hebt diese Insuffizienzerscheinungen auf, wobei die Steigerung des Zuckerverbrauchs die zuerst eintretende Wirkung ist, die später von einer entsprechenden Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch gefolgt wird. Durch eine kombinierte Dauerinfusion von Insulin (0,011 E/Min.), Azetylcholin (1,1 · 10^{-8} γ/Min.) und Adrenalin (0,055 γ/Min.) wird dieser Zustand stationär (Tabelle 12, Nr. 14). Eine Erhöhung der zugeführten Mengen um das Dreifache bringt durch die dissimilatorische Steuerungswirkung des Adrenalins (Tabelle 12, Nr. 15) eine geringe Verbrennungssteigerung zustande, die aber durch 1,0 γ k-Strophanthosid eine Änderung im Sinne der assimilatorischen Wirkung auf Sauerstoff- und Insulinverbrauch erfährt.

Der Einfluß von Strophanthin auf die Zuckerassimilation durch Insulin ist besonders schön am folgenden Beispiel des Versuchs Nr. 15 (Abb. 11 und Tabelle 13) zu sehen. Im Vorversuch fällt unter 0,0184 E/Min.

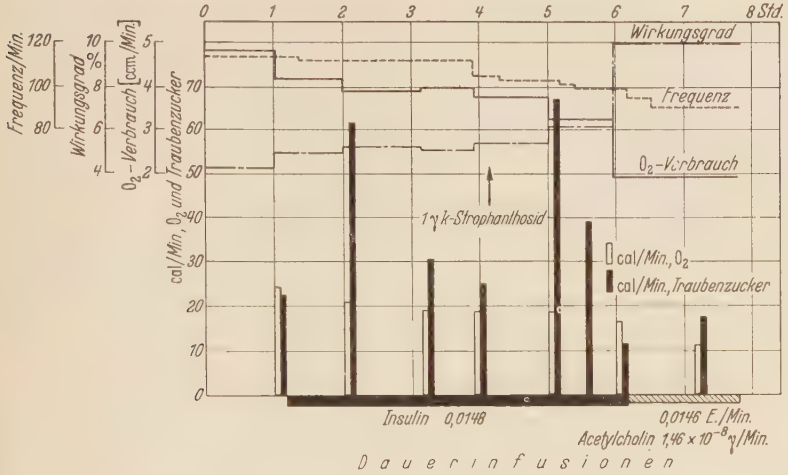


Abb. 11. Versuch Nr. 15 vom 15. VI. 38, H. L. P., Körpergewicht 6,1 kg, Herzgewicht 80 g. □ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

Tabelle 13.

Datum: 15. VI. 38, Versuch Nr. 15, Versuchsart: H.L.P., Körpergewicht: 6,1 kg, Herzgewicht: 80 g, Präparationsdauer: 15 Minuten. Versuchsdauer: 8 Stunden.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	58	112	220	104	0,443	4,72	58,0	10,35	24,3	23,3	4,28
					2–6. Insulindauerinfusion.						
2	60	112–110–110	220	104	0,443	4,08	51,0	8,94	21,0	60,7	4,96
3	72	110	220	104	0,443	3,84	48,0	8,41	19,7	30,6	5,27
4	40	110	220	104	0,443	3,88	48,5	8,50	19,9	25,3	5,21
					5. 1,0 γ k-Strophanthosid.						
5	66 (30)	104–104–102	220	104	0,443	3,74	46,8	8,19	19,2	66,3 (39,0)	5,41
6	58	102–100–98	220	104	0,443	3,22	40,3	7,06	16,6	12,1	6,27
					7. D. I. 72 = 0,0146 E Insulin + 1,46 · 10^{-8} γ Azetylcholin/Min.						
7	72	98–94–92–90	220	104	0,443	1,98	24,8	4,33	10,2	19,0	10,22

Insulin die sehr erhebliche Erhöhung des Zuckerverbrauchs aus dem Blute ins Auge, die in der ersten Stunde am stärksten mit 188% und in der zweiten und dritten Stunde mit 54% und 27,2% das Sauerstoffäquivalent übersteigt. Die Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch beträgt hingegen nur 19% (Tabelle 13, Nr. 2—4). Nach 1,0 γ k-Strophanthosid kommt es als erste Wirkung zu einer enormen Steigerung der

Insulinwirkung, infolge deren die Zuckerassimilation die Verbrennung um 247% übertrifft (Tabelle 13, Nr. 5). In der nun nachfolgenden Periode (Tabelle 13, Nr. 7) wird durch die zusätzliche Infusion des Vagusüberträgerstoffes ($1{,}46 \cdot 10^{-8}\,\gamma$/Min. Azetylcholin) die Sparwirkung auf den Sauerstoffverbrauch in der Höhe von 58% in den Vordergrund gerückt. Durch das Strophanthosid war derselbe vorher im Maximum (Tabelle 13, Nr. 6) um 31,7% gegen den Anfangswert gesenkt worden.

Wie aus allen einschlägigen Versuchen ohne weiteres hervorgeht, wird die Insulinwirkung am Herzen einwandfrei durch Digitaliskörper verstärkt. Wir führen als ein weiteres Beispiel den Versuch Nr. 12 (Abb. 2, Tabelle 4) an, wo die Wirkung von 0,008 E/Min. Insulin durch $1{,}0\,\gamma$ k-Strophanthin, nachdem in der Vorperiode, die bereits oben besprochen wurde, die Assimilationswirkung bei der kleineren Insulinmenge abgenommen hatte (Tabelle 4, Nr. 9), in Form einer Zunahme des Zuckerschwundes um 110% über das Oxydationsäquivalent verstärkt wird; eine weitere Gabe von $1{,}0\,\gamma$ k-Strophanthin erhöht die assimilierte Zuckermenge auf den enormen Wert von 370% (Tabelle 4, Nr. 12). Wesentlich erscheint auch hier, daß die Wirkung auf den Zuckerverbrauch die zeitlich zuerst auftretende ist, während die Sauerstoffsparwirkung langsamer nachfolgt. Die letztere erfährt durch eine Azetylcholindauerinfusion von $1{,}32 \cdot 10^{-8}\,\gamma$/Min. noch eine Zunahme. In Versuch Nr. 13 (Abb. 4, Tabelle 6) sehen wir das gleiche Bild der Insulinwirkungsverstärkung durch $1{,}0\,\gamma$ k-Strophanthin. Die Zuckerassimilation übertrifft in der ersten Wirkungsphase die Verbrennung um 205% (Tabelle 6, Nr. 11).

Die Rolle des Vagus unter dem Einfluß der Digitaliswirkung geht besonders klar aus dem Versuch Nr. 17 (Abb. 9, Tabelle 11) hervor. In der Vorperiode haben wir den bereits oben besprochenen dissimilatorischen Adrenalineffekt mit einer Verbrennungssteigerung und einer gleichzeitigen mangelhaften Zuckerassimilation, der das Bild einer energetischen Insuffizienz bietet, vor uns. Die erste Wirkung von $2{,}0\,\gamma$ Digilanid C besteht in einer Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs um 15,4% (Tabelle 11, Nr. 7), die weiterhin auf 28% zunimmt (Tabelle 11, Nr. 8). In dieser Phase ist der Zuckerschwund aus dem Blute um 45% höher als das kalorische Äquivalent des verbrauchten Sauerstoffs. Nach einer weiteren Gabe von $5{,}0\,\gamma$ Digilanid C sinkt der Sauerstoffverbrauch um 40% unter den Vorwert (Tabelle 11, Nr. 9—10), während das kalorische Äquivalent des verschwundenen Zuckers ihn um 53% übersteigt. Durch die nun folgende Azetylcholindauerinfusion ($3{,}5 \cdot 10^{-8}\,\gamma$/Min.) wird die Verbrennung weiterhin auf 46,5% gesenkt, die Zuckerassimilation übertrifft den Brennwert aber um 227% (Tabelle 11, Nr. 11). Eine nachfolgende Dauerinfusion von $0.55\,\gamma$/Min. Adrenalin und $3{,}0 \cdot 10^{-8}\,\gamma$/Min. Azetylcholin (Tabelle 11, Nr. 12) zeigt ein leichtes Überwiegen der assimilatorischen Vorgänge. Wichtig ist im vorliegenden Versuch die starke Kohlehydratspeicherung auf der Basis der Wirkungsverstärkung des Vagusüberträgerstoffes durch

ein Digitalisglykosid ohne zusätzliches Insulin. Es handelt sich hier um eine Wirkungsverstärkung des natürlich vorhandenen Insulins durch eine gesteigerte Vaguswirkung. Wir haben im ersten Teil der Arbeit bereits auf die enge Wirkungsbeziehung zwischen Vagus und Insulin hingewiesen. Unterstützt wird diese Anschauung weiterhin durch den folgenden Versuch Nr. 22 (Abb. 12 und Tabelle 14), der in einer Vorperiode eine recht interessante Beobachtung aufweist. Eine Arbeitsbelastung des Herzens durch Minutenvolumenvermehrungen (Tabelle 14, Nr. 1—4) zeigt in Übereinstimmung einer von uns früher schon festgestellten Gesetzmäßigkeit eine Zunahme des Wirkungsgrades. Außerdem

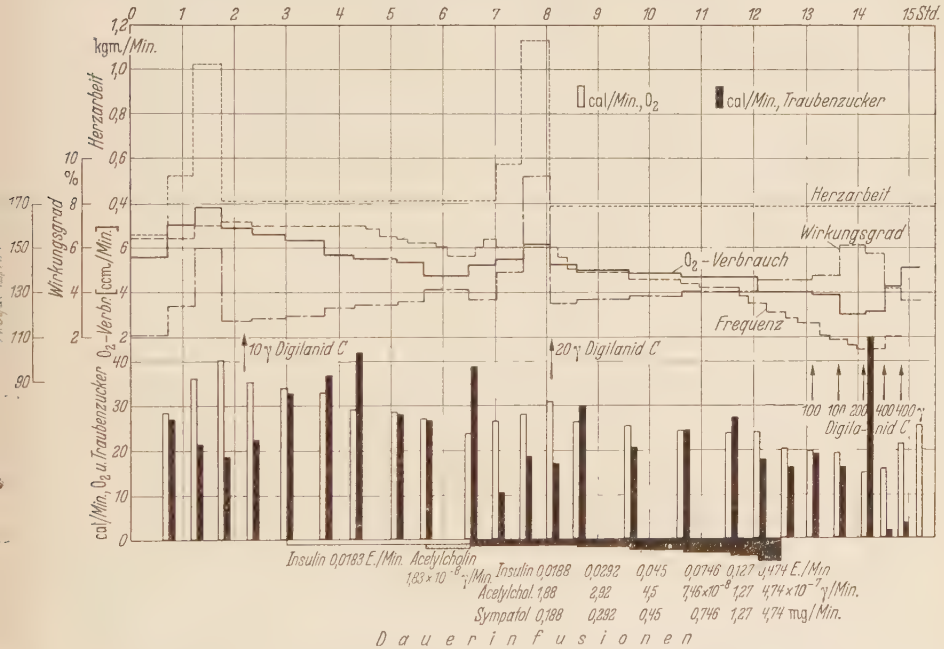


Abb. 12. Versuch Nr. 22 vom 20. XII. 38, H. L. P., Körpergewicht 6,6 kg, Herzgewicht 78 g. □ = O_2 cal/Min., ■ = Zucker cal/Min.

sehen wir, daß die erhöhten Verbrennungen nur zum Teil durch den Blutzucker gedeckt werden. Wir haben oben diese Erscheinung auf ein Überwiegen des dissimilatorischen Sympathicus zurückzuführen versucht. Auch im vorliegenden Falle dürfte diese Annahme die beste Erklärungsmöglichkeit bieten, da ja die Bereitstellung der für die Mehrarbeit notwendigen Energie durch eine Sympathicusfunktion ist. Der Zustand hält nach einer Minutenvolumenherabsetzung an, wie es ja aus dem schon früher von uns beschriebenen Zurückgehen der peripheren Vagusrestwirkung verstanden werden kann. Eine Vagussensibilisierung durch 20 γ Digi-

Tabelle 14.

Datum: 20. XII. 38, Versuch Nr. 22, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 6,6 kg, Herzgewicht: 78 g, Präparationsdauer: 19 Min., Versuchsdauer: 15 Std. 45 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	45	154	100	104	0,256	5,54	71,6	12,15	28,5	26,8	2,11
2	30	154	250	104	0,511	7,00	89,8	15,32	36,0	21,4	3,34
3	30	160	600	104	1,007	7,80	100,0	17,07	40,1	18,5	5,91
4	34	162	190	104	0,409	6,90	88,5	15,10	35,5	22,5	2,70
					5. 10 γ Digilanid C.						
5	38	160	190	104	0,409	6,58	84,4	14,44	33,9	33,1	2,83
					6–10. Insulindauerinfusion 206′ = 0,0183 E/Min.						
6	43	160	190	104	0,409	6,39	82,1	14,00	32,9	36,4	2,92
7	33	160	190	104	0,409	5,67	72,4	12,44	29,2	42,1	3,29
8	49	160–158–155	190	104	0,409	5,50	70,6	12,05	28,3	27,8	3,39
9	30	154–152	190	104	0,409	5,34	68,6	11,70	27,5	27,1	3,49
					10. Azetylcholindauerinfusion 53′ = $1{,}83 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.						
10	50	152–150–146	190	104	0,409	4,66	59,7	10,20	23,9	38,3	4,01
					11–14. D. I.117′ = 0,0188 E/Min. Insulin + $1{,}88 \cdot 10^{-8}$ γ/Min. Azetylcholin + 0,188 mg/Min. Sympatol.						
11	30	146–150–154	190	104	0,409	5,16	66,3	11,30	26,6	10,5	3,62
12	30	150	283	104	0,566	5,40	69,3	11,82	27,8	18,5	4,78
13	30	150	650	104	1,192	6,03	77,3	13,20	31,0	16,8	9,04
					14. 20 γ Digilanid C.						
14	30	150–146–142	176	104	0,384	5,17	66,4	11,34	26,6	29,5	3,39
					15. D. I. 60′ = 0,0292 E/Min. Insulin + $2{,}92 \cdot 10^{-8}$ γ/Min. Azetylcholin + 0,292 mg/Min. Sympatol.						
15	58	142–140	176	104	0,384	4,94	63,4	10,84	25,4	20,3	3,54
					16. D. I. 60′ = 0,045 E/Min. Insulin + $4{,}5 \cdot 10^{-8}$ γ/Min. Azetylcholin + 0,45 mg/Min. Sympatol.						
16	59	140–138–136	176	104	0,384	4,81	61,8	10,55	24,7	24,5	3,64
					17. D. I. 60′ = 0,0746 E/Min. Insulin + $7{,}46 \cdot 10^{-8}$ γ/Min. Azetylcholin + 0,76 mg/Min. Sympatol.						
17	56	134–132	176	104	0,384	4,66	59,9	10,22	24,00	27,1	3,75
					18. D. I. 30′ = 0,127 E/Min. Insulin + $1{,}27 \cdot 10^{-7}$ γ/Min. Azetylcholin + 1,27 mg/Min. Sympatol.						
18	30	132–130–125	176	104	0,384	4,65	59,8	10,20	23,9	18,0	3,77

Tabelle 14 (Fortsetzung).

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
		19. D. I. 30′ = 0,27 E/Min. Insulin + $2{,}7 \cdot 10^{-7}$ γ/Min. Azetylcholin + 2,7 mg/Min. Sympatol.									
19	30	125–120	176	104	0,384	3,96	50,9	8,68	20,0	15,8	4,42
		20. D. I. 40′ = 0,474 E/Min. Insulin + $4{,}74 \cdot 10^{-7}$ γ/Min. Azetylcholin + 4,74 mg/Min. Sympatol.									
20	30	120–118–116	176	104	0,384	3,93	50,0	8,60	20,2	19,3	4,46
		21. 100 γ Digilanid C.									
21	30	116–110–108	176	104	0,384	3,78	48,5	8,28	19,5	15,9	4,64
		22. 100 γ Digilanid C.									
22	30	108–106–104	176	104	0,384	2,94	37,8	6,44	15,1	45,1	5,96
		23. 200 γ Digilanid C.									
23	20	104–110	176	104	0,384	3,08	39,6	6,76	15,9	2,0	5,68
		24. 400 γ Digilanid C.									
24	20	112	176	104	0,384	4,20	54,0	9,21	21,6	4,0	4,17
		25. 400 γ Digilanid C.									
25	20	Irregularität	176	104	0,384	4,96	63,7	10,82	25,0	—	3,53

lanid C beweist dies insofern, als nun wieder die verbrannte Zuckermenge aus dem Blute assimiliert wird (Abb. 12, Tabelle 14, Nr. 5). Die nun folgende Insulindauerinfusion zeigt wiederum als die erste Wirkungsphase (Tabelle 14, Nr. 6–7) eine Zuckerspeicherung. Im weiteren Verlauf (Tabelle 14, Nr. 8–9) wird der Brennwert des Sauerstoffs aus dem Blutzucker gedeckt. Eine zusätzliche Azetylcholindauerinfusion von $1{,}83 \cdot 10^{-8}$ γ/Min. (Tabelle 14, Nr. 10) hat neben einer Sparwirkung an den Verbrennungen eine erhebliche Verstärkung der Insulinwirkung zur Folge, denn das Sauerstoffäquivalent wird durch den verschwundenen Zucker um 60% überschritten. In einer Periode von 6 Stunden wird eine Kombination von Sympatol, Azetylcholin und Insulin im gleichbleibenden Verhältnis und zunehmenden Mengen infundiert. Während des ersten Abschnittes (Tabelle 14, Nr. 11–13) wird wieder eine Arbeitsbelastung in ähnlichen Abstufungen wie im Vorversuch gemacht. Wiederum sehen wir in Bestätigung unserer Untersuchungen über die vegetativ-hormonale Stoffwechselsteuerung, daß infolge der Sauerstoffsparwirkung die Zunahmen des Wirkungsgrades jetzt erheblicher sind. Sie liegen etwa 50%

höher als im ersten Versuchsabschnitt. Wenn wir uns das Verhalten des Zuckerverbrauchs aus dem Blute ansehen, dann stellen wir fest, daß hier kein Unterschied gegen den Vorversuch feststellbar ist, d. h. die die Adaption bedingende Sympathicustonussteigerung kommt auch hier zum Vorschein. Die nachfolgenden Versuchsabschnitte zeigen, daß unter dem Einfluß von 20 γ Digilanid C und der Substitution der Assimilations- und Steuerungswirkungen über Stunden ein stationärer Zustand der Koinzidenz von Verbrennung und Zuckerverbrauch unterhalten wird.

Wir haben schon früher[2] gezeigt, daß Sympatol das Adrenalin in der Stoffwechselsteuerung vertreten kann. Die assimilatorische Wirkung kleinster Adrenalindosen findet sich ebenfalls bei den entsprechenden Mengen vom Sympatol. Es besteht insofern ein Unterschied dem Adrenalin gegenüber, als der Bereich der assimilatorischen Wirkung beim Sympatol größer ist. Digitaliskörper verschieben durch die Vaguswirkungssteigerung die Grenze zwischen den assimilatorischen und dissimilatorischen Adrenalin- und Sympatoldosen nach oben, wie dies auch hier (Tabelle 14, Nr. 18 bis 19) der Fall ist, wo die unter normalen Umständen verbrennungssteigernden Dosen von 1,27–2,7 mg/Min. Sympatol eher eine geringe Senkung des Sauerstoffverbrauchs und die Unterhaltung der Zuckerassimilation bewirken. Selbst die große Menge von 4,74 mgγ/Min. Sympatol (Tabelle 14, Nr. 20) macht keine Verbrennungssteigerung, und nur als erstes Symptom der dissimilatorischen Phase tritt ein geringer Rückgang des Zuckerverbrauchs aus dem Blute ein.

Die Steuerungswirkung im Sinne der Assimilationsförderung durch kleine Sympatoldosen geht besonders schön aus Versuch Nr. 3 (Tabelle 15) hervor. Im Vorversuch sehen wir eine typische Insulinwirkung, wie wir sie oben bereits beschrieben haben. Während einer Sympatoldauerinfusion von 0,58 mg/Min. (Tabelle 15, Nr. 5–6) stellen wir als ersten Einfluß eine Steigerung des Zuckerverbrauchs aus dem Blute fest, wobei die verbrauchte Zuckermenge das Sauerstoffäquivalent um 20% übersteigt. Späterhin entwickelt sich eine Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch, und die Zuckerassimilation übersteigt die Verbrennung um nunmehr 69%. Nach einer Gabe von 2,0 γ k-Strophanthosid, die den Sauerstoffverbrauch um 51% gegen den Ausgangswert herabsetzt und wobei der Zuckerverbrauch den Brennwert um 31% übersteigt, hat eine nachfolgende Sympatoldauerinfusion von 0,45 mg/Min. eine ausgesprochen assimilationsfördernde Wirkung. Das calorische Sauerstoffäquivalent wird um 47% durch den verschwundenen Zucker überstiegen. Eine ähnliche Sympatolwirkung nach 2.5 γ k-Strophanthosid sehen wir im Versuch Nr. 8 (Tabelle 16, Nr. 13–14), wo die assimilierte Zuckermenge die verbrauchte in der ersten Periode um 104% und in der nachfolgenden um 62% übersteigt. Am Schluß dieses Versuchs sehen wir noch ein Beispiel einer durch k-Strophanthosid verstärkten Vagusüberträgerstoffwirkung. Nach 2,5 γ k-Strophanthosid, das selbst noch keine Assimilationsförderung bewirkt, wird unter

Tabelle 15.

Datum: 8. II. 38, Versuch Nr. 3, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 7,8 kg, Herzgewicht: 88,0 g, Präparationsdauer: 13 Min., Versuchsdauer: 8 Std. 22 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	51	130	200	104	0,409	6,11	69,6	13,27	31,4	30,3	3,08
		2–3. Insulindauerinfusion 124′ = 0,057 E/Min.									
2	60	130–126–124	200	104	0,409	4,15	47,2	9,09	21,3	27,9	4,50
3	62	124–120–118	200	104	0,409	3,57	40,6	7,81	18,4	41,0	5,24
4	45	120	200	104	0,409	4,38	49,8	9,60	22,5	17,3	4,26
		5. Sympatoldauerinfusion 95′ = 0,58 mg/Min.									
5	60	120–124–128	200	104	0,409	5,24	59,6	11,47	26,9	32,4	3,56
6	32	126–120–118	200	104	0,409	4,25	48,3	9,30	20,8	35,2	4,40
		7. 2,0 γ k-Strophanthosid.									
7	52	118–112–110–102 98–94	200	104	0,409	2,93	33,3	6,41	15,1	19,8	6,39
		8. Sympatoldauerinfusion 60′ = 0,45 mg/Min.									
8	58	94–88–88	200	104	0,409	2,64	30,0	5,78	13,6	20,6	7,08

der Dauerinfusion von $7{,}5 \cdot 10^{-8}$ γ/Min. Azetylcholin (Tabelle 15, Nr. 16 bis 17) als erste Wirkung die Verstärkung der Zuckerassimilation um 136 % und in der zweiten Periode um 58 % bei erhöhter Sauerstoffsparwirkung beobachtet.

Weiterhin geht die assimilationsfördernde Steuerwirkung des Sympatols auch aus dem Versuch Nr. 4 (Tabelle 18, Nr. 11—12) hervor, wo der Brennwert während einer Dauerinfusion von 0,48 mg/Min. Sympatol durch den Zucker aus dem Blute annähernd gedeckt wird. Besonders ausgesprochen ist dieser Sympatoleinfluß im gleichen Versuch (Tabelle 18, Nr. 16 -17) mit 0,154 mg Min. zu erkennen, wo das kalorische Äquivalent um 134 % durch die Zuckerassimilation überschritten wird. Eine in der Nachperiode vorgenommene Minutenvolumensteigerung bestätigt erst einmal die von uns früher festgestellte Zunahme des Wirkungsgrades bei der Steigerung der Arbeitsleistung auf diesem Wege, zum anderen aber bleibt auch unter diesen Umständen die den Brennwert übersteigende Zuckerassimilation bestehen.

In einigen Versuchen haben wir den Einfluß der Adenylsäure* auf diese Vorgänge angesehen. So z. B. im Versuch Nr. 11 (Tabelle 17) sehen

* Aus Muskulatur isoliertes M. A. P. der Fa. Henning.

Tabelle 16.

Datum: 23. III. 38, Versuch Nr. 8, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 14,0 kg, Herzgewicht: 141 g, Präparationsdauer: 14 Min., Versuchsdauer: 13 Std. 40 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	42	140	265	107	0,620	7,52	53,4	16,50	38,7	34,8	3,75
2	45	140	265	107	0,620	7,42	52,7	16,25	38,1	35,6	3,81
		3. Insulindauerinfusion 57′ = 0,0307 E/Min.									
3	52	140	265	107	0,620	6,04	42,9	13,24	31,1	36,4	4,68
		4. Insulindauerinfusion 60′ = 0,047 E/Min.									
4	58	140–138	265	107	0,620	5,56	39,5	12,17	28,6	25,1	5,09
		5. Insulindauerinfusion 30′ = 0,076 E/Min.									
5	29	138–132–126	265	107	0,620	6,62	47,0	14,50	34,0	43,6	4,28
6	43	126	265	107	0,620	4,61	32,7	10,10	23,7	25,6	6,14
		7. 2,0 g Traubenzucker.									
7	32	120	265	107	0,620	5,66	40,2	12,50	29,1	—	4,96
		8–10. Muskeladenylsäuredauerinfusion 148′ = 0,24 mg/Min.									
8	61	120–118	265	107	0,620	4,25	30,2	9,30	21,9	20,3	6,66
9	48	118	265	107	0,620	4,40	31,2	9,63	22,6	32,4	6,43
10	24	118	265	107	0,620	4,07	28,9	8,91	20,9	8,6	6,95
11	44	118	265	107	0,620	4,08	29,0	8,94	21,0	35,1	6,93
		12. 2,5 γ k-Strophanthosid.									
12	60	118–112–110–104–102–96	265	107	0,620	3,50	24,9	7,67	18,0	9,0	8,08
		13–14. Sympatoldauerinfusion 60′ = 0,236 mg/Min.									
13	30	96	265	107	0,620	3,87	27,5	8,48	19,9	40,6	7,31
14	32	96–94	265	107	0,620	3,87	27,5	8,48	19,9	32,3	7,31
		15. 2,5 γ k-Strophanthosid.									
15	49	96	265	107	0,620	4,17	29,6	9,14	21,4	10,9	6,78
		16–17. Azetylcholindauerinfusion 90′ = $7{,}5 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.									
16	58	96–88–84–80–74	265	107	0,620	3,14	22,3	6,88	16,1	38,0	9,00
17	31	74 Block 3 : 2	265	107	0,620	2,55	18,1	5,58	13,1	20,5	11,1

wir nach einer Vorperiode mit Insulindauerinfusionen, die das immer wiederkehrende Bild der Zuckerassimilationsförderung neben einer Sauerstoffsparwirkung zeigen, den Einfluß einer Dauerinfusion von 0,076 mg/Min. Adenylsäure (Tabelle 17, Nr. 7–9). Es macht sich eine geringe Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch geltend, außerdem wird während der ganzen Zeit

Tabelle 17.

Datum: 8. IV. 38, Versuch Nr. 11, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 4,1 kg, Herzgewicht: 49 g, Präparationsdauer: 18 Min., Versuchsdauer: 11 Std. 50 Min.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	64	136	120	100	0,245	4,22	86,0	9,25	21,7	20,0	2,65
		2. Insulindauerinfusion 60′ = 0,0109 E/Min.									
2	59	136	120	100	0,245	3,94	80,4	8,64	20,2	26,1	2,83
		3. Insulindauerinfusion 60′ = 0,0174 E/Min.									
3	58	136	120	100	0,245	3,79	77,3	8,31	19,5	23,8	2,95
		4. Insulindauerinfusion 60′ = 0,0305 E/Min.									
4	63	134–132	120	100	0,245	3,67	74,8	8,04	18,9	22,2	3,05
		5. Insulindauerinfusion 60′ = 0,0477 E/Min.									
5	64	130–128–126	120	100	0,245	3,29	67,1	7,22	16,9	27,0	3,40
6	50	126–124	120	100	0,245	3,15	64,2	6,90	16,2	21,3	3,55
		7–9. Muskeladenylsäuredauerinfusion 99′ = 0,076 mg/Min.									
7	31	124	120	100	0,245	3,12	63,6	6,84	16,1	13,2	3,58
8	33	122	120	100	0,245	3,00	61,2	6,57	15,4	13,4	3,73
9	30	122	120	100	0,245	3,00	61,2	6,57	15,4	35,2	3,73
10	40	120	120	100	0,245	2,70	55,0	5,92	13,9	12,1	4,14
		11. 1,0 γ k-Strophanthosid.									
11	62	118–112–110–108–102	120	100	0,245	2,43	49,5	5,32	12,5	61,6	4,61
		12. Azetylcholindauerinfusion 78′ = $3{,}0 \cdot 10^{-8}$ γ/Min.									
12	75	102–100–98–96–94–90–88	120	100	0,245	2,15	43,7	4,71	11,1	28,9	5,21

die gesamte verbrannte Zuckermenge aus dem Blute gedeckt. Die Wirkung hält auch während einer Nachperiode von 40 Minuten an. In einem darauffolgenden Versuchsabschnitt (Tabelle 17, Nr. 11) stellen wir eine sehr ausgesprochene Sauerstoffsparwirkung und sehr starke Zuckerassimilationsförderung durch 1,0 γ k-Strophanthosid fest. Der Zuckerverbrauch überschreitet den Brennwert um den enormen Wert von 409%. Eine Bestätigung der Wirkungsverstärkung des Vagusüberträgerstoffes durch Digitaliskörper bietet die nachfolgende Azetylcholindauerinfusion, während der der Zuckerschwund den Sauerstoffverbrauch immer noch um 160% übertrifft. Ein weiteres Beispiel der Adenylsäure bietet Versuch Nr. 8 (Tabelle 16, Nr. 8–10), wo mit 0,24 mg Min. während der ersten Stunde die Verbrennungen durch den Blutzucker bestritten werden. In der zweiten

Tabelle 18.

Datum: 15. III. 38, Versuch Nr. 4, Versuchsart: H. L. P., Körpergewicht: 9,0 kg, Herzgewicht: 100 g, Präparationsdauer: 15 Min., Versuchsdauer: 14 Stunden.

Nr.	Zeit in Min.	Frequenz in Minuten	Min.-Vol. in ccm/Min.	Aortendruck mm Hg	Herzarbeit in kgm/Min.	O_2 in ccm/Min.	O_2 in ccm/kg/Min.	O_2 in kgm/Min.	O_2 in cal/Min.	Zucker in cal/Min.	Wirkungsgrad in %
1	34	132	250	106	0,614	6,60	66,0	14,45	33,9	32,7	4,25
				2. 2,5 γ k-Strophanthosid.							
2	40	132–130	250	106	0,614	5,85	58,5	12,70	30,1	20,5	4,38
				3. 2,5 γ k-Strophanthosid.							
3	50	130–126–124	250	106	0,614	5,74	57,4	12,55	29,5	25,2	4,89
				4. Insulindauerinfusion 25′ = 0,032 E/Min.							
4	25	124 120–124	250	106	0,614	5,40	54,0	11,82	27,8	52,8	5,24
				5–7. Insulindauerinfusion 132′ = 0,0481 E/Min.							
5	15	114	250	106	0,614	5,25	52,5	11,50	27,0	25,0	5,34
6	51	114–114–112	250	106	0,614	4,85	48,5	10,62	24,9	29,4	5,78
7	62	112–108–106	250	106	0,614	4,59	45,9	10,05	23,6	37,6	6,10
				8–9. Muskeladenylsäuredauerinfusion 102′ = 0,24 mg/Min.							
8	67	106	250	106	0,614	4,40	44,0	9,63	22,6	20,5	6,37
9	37	104	250	106	0,614	4,37	43,7	9,57	22,3	19,1	6,41
10	30	104	250	106	0,614	4,00	40,0	8,77	20,6	22,0	7,02
				11–12. a-Sympatoldauerinfusion 52′ = 0,48 mg/Min.							
11	35	104–106	250	106	0,614	3,73	37,3	8,17	19,2	17,5	7,51
12	20	108	250	106	0,614	4,59	45,9	10,05	23,6	20,4	6,10
				13. 1,0 g Traubenzucker.							
13	35	100	250	106	0,614	5,71	57,1	12,50	29,3	—	4,90
				14. Insulindauerinfusion 33′ = 0,132 E/Min.							
14	31	100	250	106	0,614	5,71	57,1	12,50	29,3	—	4,90
				15. Insulindauerinfusion 30′ = 0,288 E/Min.							
15	38	100	250	106	0,614	5,25	52,5	11,50	27,0	10,5	5,34
				16–17. Sympatoldauerinfusion 60′ = 0,154 mg/Min.							
16	21	100	250	106	0,614	4,85	48,5	10,63	24,9	—	5,77
17	42	100	250	106	0,614	4,56	45,6	9,98	23,4	—	6,16
18	44	100	250	106	0,614	4,56	45,6	9,98	23,4	—	6,16
19	33	100	600	106	1,153	6,17	61,7	13,50	31,7	—	8,54
20	23	100	1000	108	1,932	7,60	76,0	16,10	39,1	—	12,00
21	18	100	1200	110	2,341	8,22	82,2	18,00	42,2	—	13,00
22	17	100	1500	110	2,975	9,60	96,0	20,50	49,3	—	14,50

Periode kommt es zu einer Zuckerassimilation von 43 %, während im dritten Abschnitt nur noch 41 % des verbrannten Zuckers aus dem Blute gedeckt werden. In einer Nachperiode (Tabelle 16, Nr. 11) tritt allerdings noch einmal eine gesteigerte Zuckerassimilation auf. Auch in Versuch

Nr. 4 (Tabelle 18, Nr. 8—9) wird während einer Dauerinfusion von 0,24 mg pro Min. Adenylsäure der Brennwert des Sauerstoffs aus dem Blutzucker gedeckt, wodurch die eben angeführten Befunde noch erhärtet werden.

Wir wollen uns nun nach der Beschreibung der pharmakologischen Wirkungen den toxischen Einflüssen der Digitaliskörper zuwenden. In einer Reihe von Versuchen, in denen wir zuerst physiologische und therapeutische Beobachtungen gemacht hatten, haben wir am Schluß zunehmend größere Dosen von Digitaliskörpern den Präparaten zugesetzt.

Ein sehr instruktives Beispiel einer solchen toxischen Wirkung ist der Versuch Nr. 17 (Abb. 9, Tabelle 11, Nr. 13—21). Nach den therapeutischen Dosen von 2,0—5,0 γ Digilanid C wurde eine Menge von 50 γ gegeben, die aber auch noch die Zuckerassimilation steigert. Weitere 20 γ Digilanid C haben immer noch eine therapeutische Wirkung ebenso wie die nächsten 40 γ. Mit der nun folgenden Dose von 50 γ steigt die Gesamtmenge auf 167 γ Digilanid C. Die Wirkung dieser Menge macht sich zuerst in einer Herabsetzung der Zuckerverwertung aus dem Blute kenntlich, die mit 248—367—507 γ immer mehr zunimmt. Erst nach einer Erhöhung der Menge auf 707 γ Digilanid C kommt es nun auch zu einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs. Ein ähnliches Verhalten vom Digilanid C sehen wir im Versuch 20 (Abb. 5, Tabelle 7, Nr. 20—21), wo auch als erste Wirkung nach 110 γ die Herabsetzung der Zuckerassimilation auftritt, die nach 310 γ von einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs gefolgt ist. Im Versuch Nr. 22 (Abb. 12, Tabelle 14) liegt die Toxizitätsgrenze für das Digilanid C bei 220 γ. Nach 440 γ kommt es zu einer Herabsetzung der Zuckerverwertung und einer Sauerstoffverbrauchssteigerung, die nach 820 und 1220 γ recht erheblich zunehmen. Für das Digilanid B sehen wir ein ähnliches Verhalten (Versuch Nr. 30, Abb. 6, Tabelle 8, Nr. 16—18), dort tritt bereits nach 210 γ neben der Hemmung der Zuckerassimilation die Sauerstoffverbrauchssteigerung auf. Auch beim Digilanid A finden wir im Versuch Nr. 28 (Abb. 1, Tabelle 1, Nr. 11—12) bei 210 γ eine Herabsetzung der Zuckerverwertung unter das calorische Sauerstoffäquivalent und eine geringe Steigerung des Sauerstoffverbrauchs trotz einer fortbestehenden Insulindauerinfusion. Beim Strophanthin entwickelt sich schon nach 175 γ (Versuch Nr. 26, Abb. 7, Tabelle 9) dasselbe Bild. Während einer fortbestehenden Insulindauerinfusion nimmt die Zuckerverwertung aus dem Blute ab und der Sauerstoffverbrauch geht in die Höhe.

Besprechung.

Auch in dieser Versuchsreihe haben wir mit Dosen von Digitaliskörpern gearbeitet, die den am Menschen angewandten entsprechen, ja sie liegen zum Teil unter der unteren Grenze der therapeutischen Menschendosen. Wir haben weder das Eintreten einer Spontaninsuffizienz abgewartet noch eine solche durch Pharmaca hervorgerufen, wie wir es in

unserer ersten Arbeit auf diesem Gebiete getan hatten. Rühl[38] und Gollwitzer-Meier[39] haben in ihren Versuchen entweder die Spontaninsuffizienz abgewartet oder durch Barbiturate und Histamin eine solche künstlich erzeugt.

In unserer letzten Arbeit über die energetische Wirkung der Digitalisglykoside[3] haben wir zeigen können, daß man Einflüsse in dieser Richtung auch schon feststellen kann ohne eine dynamische Insuffizienz abzuwarten, da die durch den Innervationsausfall bedingte „energetische Insuffizienz" als Vorläufer der dynamischen bereits als Versuchsgrundlage dienen kann. Das Arbeiten in dieser Phase ist ja auch viel sicherer, als wenn nach längerer Versuchsdauer die Energievorräte stark angegriffen sind, da nach einer Erschöpfung der Vagusrestfunktion die Digitaliskörper, wie wir bereits früher erörtert haben, sogar wirkungslos bleiben können.

Die am H. L. P. auftretende Spontaninsuffizienz hat nach unserer Auffassung den zunehmenden Ausfall der Vagusinnervation durch Ausschaltung des Vaguszentrums zur Ursache. Ist nun diese Art der Herzinsuffizienz mit der in der menschlichen Pathologie beobachteten vergleichbar? Diese Frage kann man dahin beantworten, daß die Entstehungsursache sicher eine verschiedene ist, wohingegen der Zustand der Insuffizienz ein ähnlicher sein dürfte. Es gilt dies besonders für die Fälle der chronischen Herzinsuffizienz, wie wir sie in Form der Myodegeneratio cordis vor uns haben. Die Ursache dieser Herzinsuffizienz liegt auch in einem zunehmenden Versagen der Vaguswirkung, deren Grund aber nicht in einem Aufhören der zentralen Vagusversorgung und der dadurch bedingten zunehmenden Herabsetzung der Überträgerstoffbildung liegt, sondern vielmehr in einer herabgesetzten Wirkung der normal an der geschädigten Herzmuskelzelle gebildeten Überträgerstoffmengen gesehen werden muß. Das Überwiegen des Sympathicus bei der menschlichen Herzinsuffizienz geht ja auch ohne weiteres aus der als erstes Insuffizienzzeichen auftretenden Tachycardie hervor und spricht gleichfalls für eine Unterfunktion des Vagus.

Da der Vagusüberträgerstoff Azetylcholin zu den Potentialstoffen im Straubschen Sinne zu zählen ist, deren Wirkungsbedingungen wir[40] an anderer Stelle diskutiert haben, so muß eine Schädigung der Herzzellen im Sinne einer erhöhten Zellgrenzflächendurchlässigkeit für die Herabsetzung der Wirkungsintensität der in normaler Menge gebildeten Azetylcholinmengen verantwortlich gemacht werden.

Die Wirkung der Digitalisglykoside liegt nach unserer Auffassung, die wir jetzt im Gegensatz zu der in der vorigen Digitalisarbeit angenommenen Erklärung vertreten, in einer mäßig abdichtenden Wirkung an den Zellgrenzflächen, durch die es zu einer Erhöhung

[38] Naunyn-Schmiedebergs Arch. **172**, 568 (1933). — [39] Pflügers Arch. **238**, 251 (1936). — [40] Erg. Physiol. usw. **42**, 53 (1939).

des Konzentrationsgefälles und damit zu einer Intensitätssteigerung für das Azetylcholin kommt.

Vom Gesichtspunkt der Potentialtheorie her gibt es aber noch eine andere Möglichkeit der peripheren Abschwächung bzw. Aufhebung der Vagus- bzw. Azetylcholinwirkung. Sie liegt in der Beeinflussung der Fermentwirkungen. Für die Dauerwirkung eines Potentialstoffes ist ja seine Dauerzerstörung eine der Grundbedingungen. Das für die Ausbildung des wirksamen Konzentrationsgefälles notwendige Vakuum im Zellinnern wird durch die Azetylcholinesterase unterhalten. Eine Herabsetzung der Azetylcholinzerstörung im Zellinnern durch eine teilweise Fermenthemmung muß zu einer Herabsetzung des Konzentrationsgefälles und damit zu einer Wirkungsverminderung des Azetylcholins führen, die identisch mit einer Abschwächung der Vaguswirkung mit all ihren Folgen für den Herzmuskel ist. Meine Mitarbeiter Heim und Fahr[41] haben den Einfluß der Narkotica auf die Wirkung der Azetylcholinveresterung untersucht und festgestellt, daß bei höheren Konzentrationen, die den narkotischen entsprachen, bereits eine ausgesprochene Fermenthemmung feststellbar wird. Die abdichtende Membranwirkung von narkotischen Narkoticamengen hat nach den Untersuchungen Heims[42] sogar eine Intensitätssteigerung für das Azetylcholin zur Folge. Große übernarkotische Narkoticumkonzentrationen rufen nach Höber[43] u. a. eine Erhöhung der Zellgrenzflächendurchlässigkeit hervor, die mit einer Wirkungsabschwächung für einen Potentialstoff wie Azetylcholin verbunden sein muß. Innerhalb gewisser Grenzen können die Wirkungen einer Fermenthemmung durch eine Membranabdichtung kompensiert werden, d. h. wenn durch ein Barbiturat auf dem Wege über die Fermenthemmung eine Herabsetzung der Vaguswirkung und damit eine Herzinsuffizienz entsteht, so kann durch Digitaliskörper dieselbe aufgehoben werden. Eine stärkere Fermenthemmung, wie sie bei großen Dosen von Barbituraten auftritt, kann allerdings durch keine Membranwirkung, d. h. also auch nicht durch Digitaliskörper, aufgehoben werden. Diese Überlegungen werden durch die Untersuchungen von Rühl[38] und Gollwitzer-Meier[39] und Mitarbeiter bestätigt, die mit sehr großen Dosen Somnifen Herzinsuffizienzen setzten und dieselben digitalisrefraktär fanden. Ihre Annahme, daß diese Insuffizienzen in ihrem Charakter von der Spontaninsuffizienz verschieden seien, wird durch die obigen Überlegungen fundiert. Wir haben in einer früheren Arbeit den Standpunkt vertreten, daß keine prinzipiellen Unterschiede zwischen diesen beiden Insuffizienzarten beständen, was offensichtlich nach der obigen Auseinandersetzung falsch war.

Es liegt nahe, bei manchen Formen der subakuten Herzinsuffizienz, wir haben da vor allen Dingen die diphtheritischen und myocarditischen

[41] Naunyn-Schmiedebergs Arch., im Druck. — [42] Ebenda **192**, 1 (1939).
[43] Physikalische Chemie der Zelle. Leipzig 1926.

Fälle im Auge, daran zu denken, daß hier nicht nur Membranschädigungen, sondern auch Fermenthemmungen eine Rolle spielen. Von diesem Gesichtspunkt aus könnte man verstehen, daß sie doch sehr häufig digitalisrefraktär sind.

Wir haben früher eine andere Ursache der Digitalisresistenz kennengelernt, nämlich eine durch weitgehende Erschöpfung der Kohlehydratenergiereserve bedingte irreparable Störung der gesamten energieliefernden Stoffwechselvorgänge in der Herzmuskelzelle.

Eine weitere Möglichkeit der Entstehung einer Herzinsuffizienz besteht bei an sich normaler Vagusinnervation und normalen Herzmuskelzellen darin, daß eine starke Steigerung des Sympathicustonus ein Überwiegen der dissimilatorischen Stoffwechselvorgänge bewirkt. Eine solche Situation scheint beim Morbus Basedow vorzuliegen, wo ja Herzinsuffizienzerscheinungen beobachtet werden und neben anderen Symptomen die starke allgemeine Verbrennungssteigerung als Zeichen einer abnorm hohen Sympathicusfunktion angesprochen werden muß. Es wird schon beim mittelschweren Basedow am Herzen entsprechend seinem Anteil am Gesamtumsatz eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs allerdings bei noch normaler Arbeitsleistung vorliegen, d. h. es handelt sich hier schon um eine energetische Insuffizienz, der bei den schweren Fällen eine dynamische folgen kann.

Ob es neben den bislang betrachteten möglichen Entstehungsarten der Herzinsuffizienz des Menschen, die sich alle auf eine absolute oder relative Zurückdrängung der assimilatorischen Vaguswirkungen beziehen, noch andere Möglichkeiten gibt, wird sich nur durch weitere Untersuchungen entscheiden lassen. Soweit sie in einer Herabsetzung der Vagusfunktion bestehen, läßt sich aus den Wirkungsbedingungen des Potentialstoffes Azetylcholin nur noch eine Möglichkeit, nämlich die einer Schädigung des Vaguszentrums und der dadurch bedingten Herabsetzung der Potentialstoffbildung anführen, die ja bei der Spontaninsuffizienz des H. L. P. die Hauptrolle spielt. Uns ist kein klarer Fall aus der menschlichen Pathologie bekannt, der als Beispiel für diese Möglichkeit dienen könnte.

Die bisher betrachteten Fälle von Herzinsuffizienz beziehen sich auf die langsame Entstehung. Wie liegt nun der Fall bei den akut auftretenden Herzinsuffizienzen, wie sie z. B. beim Kollaps beobachtet werden. Sie sind wohl nicht in der Hauptsache auf die bislang erörterten Ursachen zurück zuführen. Hier liegt das Versagen nicht so sehr in einer mangelhaften Kohlehydratassimilation und Speicherung, sondern viel eher in der erschwerten Energiemobilisierung. Dies läßt sich allerdings vorläufig nur ex iuvantibus sagen, denn in diesen Fällen sind die Sympathicusmittel, wie das Sympatol u. a., schon wegen ihrer sehr schnellen Wirkung am wirksamsten, wobei die dissimilatorische Phase ihrer Steuerwirkung der größeren Dosen im Vordergrund steht.

Die souveränen Mittel zur Behandlung der chronischen Insuffizienzen, wie wir sie oben besprochen haben, sind auf Grund ihres Wirkungscharakters die Digitalisstoffe. Wie wir bei der Besprechung der einzelnen Versuche gesehen haben, fördern Diditaliskörper — wir haben k-Strophanthin, k-Strophanthosid und Digilanid A, B und C untersucht — die Zuckerassimilation, d. h. es verschwinden aus dem Blute Zuckermengen, die dem Sauerstoffverbrauch äquivalent sind, wenn vorher als erstes Zeichen der energetischen Insuffizienz nur ein Bruchteil des Brennwertes aus dem Blutzucker gedeckt wurde. Außerdem können sie auch den Brennwert in mehr oder weniger starkem Grade übersteigen. Diese Wirkung tritt ohne von außen zugeführtes Insulin ein.

Wie wir im physiologischen Teil gezeigt haben, besteht eine enge Koppelung der Vagus- und Insulinwirkung. In unseren früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, daß die Digitaliskörper eine erhebliche Verstärkung der Azetylcholinwirkung hervorrufen, wie es sich aus der Einschränkung der Verbrennungen ergab, die wir als ersten Einfluß der assimilatorischen Vaguswirkung erkannt hatten. Wir führen daher die erhöhte Zuckerassimilation durch die Digitaliskörper auf eine Wirkungsverstärkung der kleinen beim frischen H. L. P. noch vorhandenen Insulinmengen zurück, die auf dem Wege über die Steigerung der restlichen peripheren Vagusfunktion abläuft. Eine weitere Stütze findet diese Anschauung in der Beobachtung, daß nach Abklingen der Digitaliswirkung infolge des weiteren Zurückgehens der peripheren Vagusrestfunktion durch Azetylcholindauerinfusionen eine erneute Kohlehydratspeicherung bewirkt werden kann. Die hierzu notwendigen Azetylcholinmengen entsprechen den früher bereits für die Sauerstoffsparwirkung unter Digitaliskörpern wirksamen.

Neben der Zunahme der Zuckerassimilation sehen wir immer eine ausgesprochene Sauerstoffsparwirkung eintreten, wodurch unsere früheren Beobachtungen bestätigt werden. Dabei ist in den Versuchen mit und ohne Azetylcholin die Steigerung der Zuckerassimilation immer die zuerst auftretende Wirkung.

Bei längerdauernden Insulindauerinfusionen haben wir, wie schon oben gezeigt wurde, zuerst eine recht erhebliche Kohlehydratspeicherung gesehen, die allmählich etwas nachläßt. Wird in diesem Zeitpunkt ein Digitaloid oder Digitalisglykosid gegeben, dann kommt es als erstes Zeichen zu einer ganz ausgesprochenen Zunahme der Kohlehydratspeicherung, die mit einer langsam beginnenden und erst später intensiver werdenden Sauerstoffsparwirkung verbunden ist.

Wie wir bereits im physiologischen Teil erörtert haben, kann die Insulinwirkung durch den Vagus erheblich verstärkt werden, ebenso wie eine Steigerung der Vaguswirkung durch das Insulin möglich ist. Die von uns durchgehends beobachtete Verstärkung der Insulinwirkung durch Digitaliskörper geht wohl mit großer Wahrscheinlichkeit auch

auf dem Wege über die gesteigerte Vagusfunktion vor sich, da ja die periphere Sensibilisierung der Zellen durch Digitaliskörper gegen die bei der Vagusrestfunktion gebildeten Azetylcholinmengen zu einer recht erheblichen Wirkungsverstärkung derselben führt.

Sehr wesentlich erscheint uns die Bedeutung des zeitlichen Eintritts der einzelnen Einflüsse zu sein. Die erste Wirkung ist auch hier die Verbesserung der Zuckerverwertung oder sogar eine ausgesprochene Kohlehydratspeicherung, die dann von der sich langsamer entwickelnden Bremsung der Verbrennungen gefolgt wird. Durch Kombination von Azetylcholin-Insulin-Adrenalindauerinfusionen in entsprechenden Mengen kann man auch nach Digitaloiden und Digitalisglykosiden einen stationären Zustand erreichen, während dessen der Brennwert des verbrauchten Sauerstoffs durch äquivalente Zuckermengen aus dem Blute gedeckt wird. Wie wir im physiologischen Teil gezeigt haben, ist das erste Zeichen einer mangelhaften Vagusfunktion die Abnahme der Fähigkeit des Herzmuskels Zucker aus dem Blute aufzunehmen und ihn auf dem Wege über die Assimilationsstufe der Verbrennung zugänglich zu machen. Erst wenn dieser Zustand länger bestanden hat, kommt als nächstes Zeichen der abnehmenden Vaguswirkung eine weitere Steigerung des Sauerstoffverbrauchs zustande, dem später die dynamische Herzinsuffizienz folgt. Wir haben in einer früheren Arbeit[1] gezeigt, daß bei einer dynamischen Herzinsuffizienz das erste Symptom der Digitaliswirkung die Einschränkung des pathologisch hohen Sauerstoffverbrauchs ist, dem nach einem gewissen Zeitraum die Aufhebung der dynamischen Insuffizienz folgt. In den vorliegenden Versuchen haben wir gesehen, daß der erste Effekt der Digitaliskörper die Förderung der Zuckerassimilation ist, nach ihr tritt dann die Sauerstoffsparwirkung ein.

Die Reihenfolge des Eintritts der Herzinsuffizienzerscheinungen gibt uns Anlaß zu einer verallgemeinernden Bemerkung. Es scheint so, daß bei sehr vielen toxischen Zellschädigungen verschiedenster Genese zuerst eine Schwächung der Insulin-Vaguswirkung eintritt, die je nach Schwere zunehmend den Grad einer vollkommenen Ausschaltung erreichen kann. Das relative oder absolute Überwiegen des Sympathicus unterhält durch die Mobilisierung der vorhandenen Energievorräte die Funktion für eine Zeit, trägt aber gleichzeitig bei schweren Schädigungen zur schnellen Erschöpfung der Energiereserven bei. Die assimilatorische Insulin-Vaguswirkung muß als eine Grundfunktion des normalen Organismus und seiner Teile angesehen werden, insofern als sie erst die Voraussetzung in Form der Brennstoffe für die energetische Transformation in die spezifische Organleistung und die allgemeinen Funktionen der Wärmebildung schafft. Schwere Störungen dieser Grundfunktion auch nur an einem Organ werden oft lebensgefährdend. Wir führen hier als Beispiel die Leber an, die wohl neben dem Herzen in dieser Richtung am meisten gefährdet ist. Schon geringfügige Schädigungen, wie eine kurzdauernde Asphyxie, bewirken bei

ihr eine Glykogenverarmung, der z. B. im Falle der Knollenblätterschwamm-Phosphorvergiftung usw. die degenerative Verfettung als Extrem der assimilatorischen Aufbaustörung folgt. Von diesem Gesichtspunkt aus müssen Heilmittel, die die gestörte Insulin-Vagusfunktion mehr oder weniger wiederherstellen, nach dem Grade der Vollkommenheit ihrer Wirkung gewertet werden.

Von diesem Standpunkt aus gesehen wird uns auch die oft ans Wunderbare grenzende Heilwirkung der Digitalis verständlich, denn sie besitzt den Einfluß auf das Vagus-Insulinsystem in vollkommenem Maße. Bei der Betrachtung der einzelnen Wirkungsphasen sehen wir, daß die Digitaliswirkung die Symptome der Herzinsuffizienz in der Reihenfolge beseitigt, wie sie einzutreten pflegen, d. h. zuerst behebt sie die mangelhafte Zuckerassimilation, dann setzt sie den erhöhten Sauerstoffverbrauch herab und zuletzt wird die verminderte mechanische Arbeitsleistung wieder normal.

Wir haben im ersten Teil der Arbeit zeigen können, daß der Überträgerstoff der Sympathicuswirkung das Adrenalin in kleinsten Dosen auch am Kohlehydratstoffwechsel eine Steuerungswirkung im assimilatorischen Sinne entfaltet, so daß es zuerst zu einer Steigerung der Zuckerassimilation neben der nachfolgenden Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch kommt. Wir möchten diesen Einfluß auf eine ähnliche Weise erklären wie die schon früher beobachtete Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch. Nach dieser Auffassung kommt die assimilatorische Steuerwirkung des Sympathicus bzw. kleinster Adrenalinmengen auf dem Wege über eine Verstärkung der Vaguswirkung zustande. Die gleiche Wirkung kann man auch für das Sympatol feststellen. Wir haben in früheren Arbeiten gezeigt, daß das Sympatol in seiner Wirkung durchaus dem Adrenalin ähnlich ist. Es liegt nur ein quantitativer Unterschied in den einzelnen Wirkungsarten vor. So stellen wir auch hinsichtlich der Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels des Herzens fest, daß die assimilatorische Steuerungsphase des Sympathols breiter ist als die des Adrenalins, m. a. W. Mengen von 0,6–0,8 mg Min. abwärts bewirken eine vermehrte Zuckerassimilation, während es in größeren Dosen ähnlich wie das Adrenalin den Zuckerverbrauch aus dem Blute einschränkt.

In früheren Untersuchungen konnten wir an den Verbrennungen feststellen, daß durch die Strophanthinwirkung der Adrenalin- und Sympatoleinfluß in der Weise verschoben wird, daß größere an sich dissimilationsfördernd wirkende Mengen assimilatorisch wirksam werden. Wir können diesen Befund dahin erweitern, daß auch unter Einbeziehung des Kohlehydratstoffwechsels dasselbe gilt. Es kommt z. B. nach der Injektion von Strophanthin und Digilanid A, B und C durch Dauerinfusionen hoher Sympatoldosen (z. B. 4,0 mg Min.) zu einer ausgesprochenen Steigerung der Zuckerassimilation. Die Erklärung dürfte wohl auch wieder in der

Sensibilisierung des Vagus zu suchen sein, indem er durch sein Überwiegen die Steuerungsfunktion des Sympathicus bzw. die Wirkung der sympaticomimetischen Stoffe derart verschiebt, daß die assimilatorische Phase der Steuerungswirkung einen breiteren Raum einnimmt als unter normalen Bedingungen.

Aus diesen Beobachtungen würde sich für die Therapie die Möglichkeit ergeben, die Digitaliswirkung durch gleichzeitige Sympatolgaben zu unterstützen oder aber eine Nachbehandlung nach einer Digitalisierung mit dem Sympatol in Dosierungen durchzuführen, die die Assimilationsvorgänge unterstützen.

An dieser Stelle möchten wir noch andere Möglichkeiten betrachten, die zur Unterstützung der Digitaliswirkung ausgewertet werden können. Wir haben schon oben den Fall erwähnt, wo durch eine langdauernde Herzinsuffizienz im Endstadium eine starke Erschöpfung der Energievorräte, infolge der Unfähigkeit des kranken Herzmuskels Glykogen zu speichern, vorliegt. Hier bleibt je nach Schwere des Zustandes Digitalis häufig wirkungslos. Der Kliniker bezeichnet ein solches Herz als digitalisrefraktär. Bei normaler Vaguszentrumsfunktion liegt in einem solchen Falle durch die periphere Digitalissensibilisierung sicher ein ausreichender Vaguseinfluß vor, die Störung ist hier wohl im wesentlichen in der mangelhaften Insulinwirkung zu suchen. Man könnte versuchen, durch gleichzeitige Insulin-Traubenzuckerzufuhr die unzureichende Zuckerassimilation in Gang zu bringen. Wenn erst einmal dieser Prozeß angekurbelt ist, dann bewirkt Digitalis das Weiterlaufen im oben erörterten Sinne. Man könnte die Zweckmäßigkeit der Insulinzufuhr beim pankreasgesunden Menschen bezweifeln. Wir glauben aber, daß bei derartig schweren und langdauernden Herzinsuffizienzen die Pankreasfunktion durch Stauung und Asphyxie auch nicht mehr normal ist, deshalb geht man mit der künstlichen Zufuhr bei solchen Fällen sicherer. Wir würden die gleichzeitige Digitalis-Insulin-Traubenzuckerbehandlung auch bei der diphtherischen Herzinsuffizienz als indiziert ansehen. Der Endzustand der degenerativen Verfettung des Herzmuskels weist ja auf die tiefgreifenden Stoffwechselstörungen hin, die man durch rechtzeitiges Eingreifen in der oben angegebenen Weise wird verhindern können. Auch bei der akuten Myocarditis könnte das gleiche Vorgehen ratsam sein. Ganz allgemein wird die zusätzliche Insulinwirkung ohne irgendwelche Gefährdung nur Nutzen bringen.

Aus den Beobachtungen am Herz-Lungen-Präparat kann man auf die Zweckmäßigkeit gerade dieser Maßnahmen schließen. Den Angriffspunkt für die wichtigsten Digitaliswirkungen bildet die Vagusfunktion und eng mit ihr gekoppelt die Insulinwirkung. Beim H. L. P. sind beide Faktoren durch die Isolierung nur für eine begrenzte Dauer wirksam, daher entwickelt sich im Laufe eines Versuchs eine zunehmende Digitalisresistenz. Hierin darf man wohl einen Grund suchen, warum manche Untersucher

am H. L. P. keine Digitaliswirkungen feststellen konnten. Setzt man dagegen dem H. L. P. Insulin zu, so genügt das oft schon allein, um sehr ausgesprochene Digitaliseffekte zu bekommen, noch besser werden sie unter zusätzlichen Azetylcholindauerinfusionen.

Die erste Voraussetzung für eine Digitaliswirkung ist die Existenz eines Angriffspunktes, der sowohl im Tierexperiment wie auch beim herzkranken Menschen mangelhaft sein kann. Dabei scheint bei der menschlichen Herzinsuffizienz für Digitalis am ehesten der Wirkungsweg über das Insulin erschwert zu sein. In diesem Zusammenhange geben unsere Befunde der Steigerung der Insulinwirkung durch Digitalis auch die Erklärung für die günstige Zusatzwirkung des Traubenzuckers bei der Strophanthininjektion. Die relativ kleine Zuckermenge spielt vom kalorischen Gesichtspunkt aus keine Rolle, außerdem kann sie nach unseren Beobachtungen auch nicht direkt verwertet werden. Ihre Wirkung liegt in der Pankreasreizung begründet. Der Blutzuckerspiegel ist ja der adäquate Reiz für die Insulinsekretion des Pankreas. Da der Traubenzucker in diesem Falle intravenös injiziert wird, macht er eine vorübergehende Erhöhung des Blutzuckerspiegels, die ausreicht, um eine Insulinausschüttung aus dem Pankreas zu bewirken. Durch den Synergismus Strophanthin-Insulin wird die Wirkung beider intensiviert und dadurch zweifellos eine bessere Wirkung auf das insuffiziente Herz ausgeübt als durch Strophanthin allein.

In einigen Versuchen wurde eine Infusion von Adenylsäure gemacht, während deren Dauer der Brennwert des Sauerstoffs aus dem Blutzucker gedeckt wurde. Es scheint also dieser Stoff die assimilatorische Zuckerverwertung zu begünstigen. Die Klärung des Wirkungsmechanismus muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Wir haben in unseren Untersuchungen besonderen Wert auf die Dosierung der Digitaliskörper gelegt. Unsere Befunde am H. L. P. sind von anderen Untersuchern, so von Rühl[38], nicht bestätigt worden. An Stelle der Sparwirkung am Sauerstoffverbrauch fand er nach Strophanthin eine Zunahme. Wir haben schon früher diese Steigerungen der Verbrennungen als eine toxische Digitaliswirkung erkannt. Wenn wir uns nun die toxischen Wirkungen der einzelnen Digitaliskörper unter Einbeziehung des Zuckerstoffwechsels betrachten, so haben sie qualitativ bei allen den gleichen Charakter. Das erste Symptom ist die Herabsetzung der Zuckerverwertung aus dem Blute, in einem mehr oder weniger weiten Abstand folgt die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs, und bei ganz schweren Vergiftungen kommt es dann auch zu einer Herabsetzung der Leistungsfähigkeit des Herzmuskels. Die Entwicklung der Schädigungen durch Digitalis zeigt also die gleiche Reihenfolge, wie wir sie bei der Spontaninsuffizienz beobachtet und beschrieben haben.

Der Grad der Vergiftung ist eine Funktion der Dosengröße. Wenn eine kleine toxische Dose gegeben worden ist, dann tritt nur die Hemmung

der Zuckerassimilation auf. Nach einer größeren Menge wird zuerst die Herabsetzung der Zuckerassimilation manifest, welche dann im Laufe einer halben Stunde von einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs gefolgt wird. Bei sehr großen Dosen kommt es nach dem Eintritt der beiden eben beschriebenen Symptome der energetischen Insuffizienz zur Dilatation, Herabsetzung des Minutenvolumens, Erhöhung des Vorhofdruckes und starken Irregularitäten, d. h. zu einer dynamischen Insuffizienz. Der zeitliche Ablauf des Vergiftungsbildes ist relativ langsam und kann durch eine Erhöhung der Dosierung nicht beschleunigt werden. Am schnellsten entwickelt sich das Bild beim k-Strophanthin, etwas langsamer beim Digilanid A, B und C.

Aus der Spanne der therapeutisch wirksamen zu den toxischen Glykosidmengen ergibt sich die Möglichkeit, am H. L. P. die therapeutische Breite der einzelnen Glykoside zu bestimmen. Natürlich gehört zu einer genauen Bestimmung eine größere Zahl Versuche, als wir sie zu diesem Zwecke angestellt haben. Wir können nur einen ungefähren Wert angeben.

Wenn wir den Quotienten $\frac{\text{toxische Dose}}{\text{therapeutische Dose}}$ bestimmen, wobei die Mengen in γ ausgedrückt sind, so gibt dieser Wert die therapeutische Breite des betreffenden Glykosids an. Wir haben als toxische Wirkung die zweite Stufe der energetischen Insuffizienz genommen, d. h. die erste Sauerstoffverbrauchssteigerung als toxischen Grenzwert gesetzt. Als therapeutische Dose haben wir die Menge genommen, die gerade eine Sauerstoffverbrauchssenkung bei einer energetischen Insuffizienz bewirkt. Aus dem Durchschnitt unserer Beobachtungen bekommen wir für das k-Strophanthin und k-Strophanthosid den Wert von etwa 50—70, für das Digilanid A und B etwa 35—45 und das Digilamid C etwa 70—100.

M. B. Visscher[44] hat auch am H. L. P. eine vergleichende Untersuchung der Glykoside der Digitalis lanata gemacht. Als Maß der therapeutischen Wirkung nimmt er eine Verbesserung des Wirkungsgrades der Herzarbeit und als das toxische das Auftreten von Irregularitäten durch die entsprechenden Mengen des Digitaliskörpers. Dabei arbeitet er allerdings mit sehr hohen Dosen 0,5—2,0 mg Digilanid A, B oder C, nur in einem Falle wendet er 20 γ Digilanid C an. Es würden 0.5 mg 16.9 mg und 1.0 mg 33.8 mg und 2.0 mg 67,6 mg Digilanid A, B oder C am ganzen Menschen entsprechen. Er kommt zu dem Ergebnis, daß beim Digilanid A das Verhältnis 0.5 und für das Digilanid B 0,45 und das Digilanid C 4 ist, d. h. Digilanid A und B haben überhaupt keine therapeutische Breite, während beim Digilanid C die toxische Dose den vierfachen Wert der therapeutischen ausmacht. Mit diesen Feststellungen stehen unsere Ergebnisse im Widerspruch insofern, als auch Digilanid A und B eine therapeutische Breite haben. Die einzige Übereinstimmung ist die, daß das Digilanid C die größte therapeutische Breite hat.

[44] J. Pharmacol. (Am.) **64**, 65 (1938).

Visscher nimmt als toxisches Zeichen das Auftreten von Irregularitäten. Wir glauben nicht, daß dieses Symptom eine sehr scharfe Grenze darstellt. Wenn man schon ein dynamisches Insuffizienzzeichen als Kriterium wählt, so eignet sich der viel genauer meßbare Vorhofsdruck wesentlich besser. Außerdem ist der Vergleich eines reinen energetischen Symptoms der therapeutischen Wirkung mit dem rein dynamischen des toxischen Effekts auch nicht sehr glücklich. Demgegenüber scheint uns der Bezug auf den gleichen energetischen Vorgang bei beiden Wirkungen den Vorzug zu verdienen.

Die Visschersche Feststellung, daß Digilanid A und B überhaupt keine therapeutische Breite haben, ist schon aus einem allgemein pharmakologischen Grunde nicht sehr wahrscheinlich, denn bei verschiedenen Dosen fast aller Arzneimittel und Gifte werden durchgehend Wirkungsunterschiede quantitativer und qualitativer Natur beobachtet. Bei der chemisch nahen Verwandtschaft der einzelnen Digitalisglykoside ist daher eine so grundsätzliche Abweichung noch weniger denkbar. Wir glauben, daß die von uns gefundenen Zahlen wohl der Wirklichkeit näher kommen als die Visscherschen. Danach hat das Digilanid C ungefähr die doppelte therapeutische Breite als A und B, während das Strophanthin eine Mittelstellung zwischen ihnen einnimmt. Die Spannen zwischen therapeutischer und toxischer Dose scheinen sehr weit zu sein, wenn man aber die subtilen Reaktionen bedenkt, auf die sie sich beziehen, so werden die Werte schon verständlich.

Man darf natürlich diese Zahlen unter keinen Umständen direkt auf die Dosierung beim herzkranken Menschen übertragen. Eine sehr wesentliche Einschränkung müssen diese Zahlenverhältnisse beim chronisch erkrankten Herzmuskel deshalb erfahren, weil in diesem Falle die Energievorräte, die beim Eintritt der toxischen Wirkung als Puffer dienen, sehr stark herabgesetzt sind. In mancher Hinsicht wäre für die Feststellungen solcher Verhältniszahlen das Arbeiten an einem chronisch insuffizienten Herzen vorteilhafter. Bisher ist es überhaupt nicht möglich, chronische Herzinsuffizienzen experimentell zu erzeugen. Selbst wenn dies möglich wäre, würde die zu vergleichenden Untersuchungen notwendige Übereinstimmung des Insuffizienzgrades ein kaum zu überwindendes Hindernis darstellen. Auf jeden Fall aber geben uns die in unseren Versuchen gewonnenen Zahlen doch einen brauchbaren Anhaltspunkt über die Beziehung der therapeutischen zur toxischen Wirkung der einzelnen Glykoside.

Wenn wir an dieser Stelle einmal kurz auf die Frage der Digitalisempfindlichkeit der einzelnen Herzen eingehen, so würde aus unseren Beobachtungen sich der Schluß ergeben, daß die Herzen bei einer hohen Sympathicotonie unempfindlicher gegen Digitalis sein müssen als bei einer hohen Vagotonie. Diese Anschauung kann das Verständnis einer Reihe von klinischen Beobachtungen fördern, so z. B. die Feststellung von Romberg[45] und Edens, daß die Digitaliswirksamkeit vermindert

[45] Lehrbuch der Herz- und Gefäßkrankheiten.

ist bei Fiebernden. Nun ist ja die Stoffwechsellage der fieberkranken Menschen durch eine gesteigerte Sympathicuswirkung charakterisiert, wie sie an den Symptomen der Verbrennungssteigerung und der Tachycardie erkannt werden kann. Als Beispiel einer Digitalisüberempfindlichkeit könnten die Erfahrungen mit Strophanthin bei der Angina pectoris nervosa dienen, wo neben seiner Wirkungslosigkeit auch Verschlechterungen des Zustandes beobachtet wurden. Da bei der Angina pectoris nervosa eine starke Vagotonie die Hauptursache bildet, könnte die Verstärkung der Vagusempfindlichkeit den Grund für die schädliche Strophanthinwirkung abgeben.

Wie wir bereits gezeigt haben, kann man am H. L. P. mit der von uns angewandten Methode die therapeutische Breite verschiedener Digitaliskörper bestimmen. Außerdem ergibt sich die Möglichkeit mit den den therapeutischen Menschendosen entsprechenden Glykosidmengen einen Vergleich der therapeutischen Wirksamkeit festzustellen. Man bestimmt die kleinsten Mengen, die gerade einen Einfluß auf die energetische Insuffizienz des Herzens haben. Wir haben auf diese Weise das kristallisierte k-Strophanthosid (Strophosid-Sandoz) mit dem amorphen k-Strophanthin (Kombetin-Boehringer) verglichen. Dabei hat sich herausgestellt, daß zwischen ihnen kein Wirkungsunterschied besteht. Die Bedeutung der Reindarstellung des Glykosids und seine Konstitutionsermittlung durch Stoll ist unter keinen Umständen zu unterschätzen. Wenn das kristallisierte reine k-Strophanthosid keine stärkere Wirkung besitzt, so ist das dadurch verständlich, daß im k-Strophanthin etwa 80% k-Strophanthosid enthalten sind.

Wir haben in einer früheren Untersuchung zeigen können, daß sich am isolierten Warmblüterherzen die Latenzzeit der Sauerstoffsparwirkung der einzelnen Glykoside gut feststellen läßt. Für das k-Strophanthin fanden wir sie zu 5—10 Minuten und für das Digitoxin zu 1—2 Stunden. Im Vergleich dazu haben wir für die drei Digilanide Latenzzeiten von 15—30 Minuten feststellen können. Betrachten wir diese Werte nebeneinander, so kommen wir zu dem Resultat, daß Digilanid A, B und C hinsichtlich der Latenzzeit zwischen dem Strophanthin und Digitoxin stehen, und daß ihre Latenzzeit nicht den Mittelwert beider darstellt, sondern näher nach dem Strophanthin zu liegt. Wenn man diese Beobachtungen mit den Wirkungen am dynamisch insuffizienten Herzen in Beziehung bringen will, so muß man darauf Rücksicht nehmen, daß der Reihenfolge nach zuerst die energetischen Insuffizienzerscheinungen der Kohlehydratassimilation und des Sauerstoffverbrauchs aufgehoben werden, und daß erst in einem gewissen Abstand, der ungefähr 15—30 Minuten betragen kann, die dynamische Insuffizienz auch wieder der normalen Leistungsfähigkeit des Herzmuskels Platz macht.

Aus unseren bisherigen Untersuchungen am H. L. P. ergibt sich die Möglichkeit, unter recht konstanten experimentellen Bedingungen den

Wirkungscharakter von herzwirksamen Stoffen zu analysieren. Zudem besteht auch die Möglichkeit des Vergleichs der einzelnen Stoffe, wobei die angewandten Dosen denen adäquat sind, die sich aus den Erfahrungen aus der Therapie des herzkranken Menschen ergeben.

Aus unseren Beobachtungen können wir nicht nur eine Erklärung eines großen Anteils der therapeutischen Anwendung und Wirkung der Digitaliskörper am herzkranken Menschen ableiten, sondern wir sehen besonders in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit, neue Erkenntnisse auf die Therapie zu übertragen. Wir denken hier in erster Linie an die gleichzeitige Anwendung von Insulin-Traubenzucker und Digitalis besonders bei den schwersten Herzinsuffizienzen, wie auch an die Ausnutzung der assimilatorischen Phase der Stoffwechselsteuerung durch Sympathicusmittel, von denen in erster Linie das Sympatol genannt werden muß.

Wenn es gelingen sollte, auf diese Art das Wirkungsgebiet der Digitaliskörper zu erweitern, so wäre das ein neuer Beleg für die direkte Übertragungsmöglichkeit der Ergebnisse des Tierexperiments auf die Therapie des kranken Menschen. Wenn dieses Vorgehen auch nicht immer ohne weiteres realisierbar ist, so muß es doch unser Bestreben sein, durch Verbesserungen und Weiterentwicklung der tierexperimentellen Methoden, wie wir sie Karl Ludwig, I. P. Pawlow, E. H. Starling und anderen verdanken, die pharmakologische Analyse in zunehmendem Maße diesem Ziel näherzubringen.

Zusammenfassung.

1. Der Herzmuskel kann den Traubenzucker, der dem Blute zugesetzt ist, nicht direkt verbrennen, er wird erst auf dem Wege über seine Assimilationsphase das Glykogen der Verbrennung zugänglich gemacht.

2. Die Traubenzuckerassimilation ist eine Funktion des Insulins. Diese Insulinwirkung ist aufs engste mit der Vagusinnervation bzw. der Wirkung seines chemischen Überträgers Azethylcholin gekoppelt.

3. Das Insulin vermag die Sauerstoffsparwirkung des Vagus zu verstärken. Der Vagus bzw. sein chemischer Überträger, das Azetylcholin, kann seinerseits den Insulineinfluß auf die Zuckerassimilation vermehren.

4. Ein hoher Sympathicus tonus bzw. die ihm zugeordnete Überträgerstoffmenge Adrenalin hemmt die Zuckerassimilation aus dem Blute und bewirkt den Verbrauch einer entsprechenden Menge des Herzglykogens. Unter einem niedrigen Sympathicustonus bzw. den ihm zugeordneten kleinsten Adrenalinmengen kommt es zu einer Förderung der Zuckerassimilation, so daß eine dem Sauerstoffverbrauch äquivalente Menge Zucker aus dem Blute verbraucht oder sogar eine überschießende Menge als Glykogen angelagert wird.

5. Die am denervierten Warmblüterherzen beobachtete Zuckerassimilationshemmung ist die Folge eines Überwiegens der peripheren Sympathicusfunktion, deren Ursache in dem zunehmenden Absinken der Vagusinnervation zu suchen ist.

6. Die Zuckerassimilationshemmung ist ein neues Symptom der energetischen Insuffizienz. Sie ist gleichzeitig das erste Insuffizienzsymptom, dem als zweites die Sauerstoffverbrauchszunahme bei gleichbleibender Herzleistung folgt. Die dynamische Insuffizienz tritt erst ein, wenn eine Erschöpfung der Vagus-Insulinfunktion vorliegt. Die Schwere einer Herzinsuffizienz hängt vom Grade dieser Erschöpfung ab.

7. Die Digitalisglykoside erhöhen durch eine mäßige Herabsetzung der Membranpermeabilität das Konzentrationsgefälle und die von ihm abhängige Wirkungsintensität einer bestimmten Menge des Vagusstoffes Azetylcholin, d. h. sie führen eine erhebliche Steigerung des peripheren Vagustonus herbei.

8. Die Digitaliskörper machen auf dem Wege der Vagustonussteigerung und der Funktionsverbindung eine Wirkungsverstärkung der am frischen H. L. P. vorhandenen kleinen Insulinmengen oder auch des zugeführten Insulins. Die hierdurch gesteigerte Zuckerassimilation kann das kalorische Sauerstoffäquivalent um 100% und mehr überschreiten.

9. Die Reihenfolge des Eintritts der Digitaliswirkung am geschädigten Herzen entspricht der Reihenfolge des Eintritts der einzelnen Insuffizienzzeichen. Es kommt daher:

a) die Beseitigung der Zuckerassimilationshemmung,
b) die Herabsetzung des pathologisch hohen Sauerstoffverbrauchs.
c) die Aufhebung der dynamischen Insuffizienz.

10. Die hochgradige Erschöpfung der Vagus-Insulinfunktion bei schwersten Herzinsuffizienzen ist die Ursache der Wirkungslosigkeit von Digitaliskörpern. Es kann erwartet werden, daß bei solchen Herzen durch eine gleichzeitige Traubenzucker-Insulinbehandlung der Angriffspunkt für die Digitaliskörper wiederhergestellt wird.

11. Die Symptome der toxischen Digitaliswirkung sind in der Reihenfolge ihres Eintritts:

a) die Zuckerassimilationshemmung,
b) die Sauerstoffverbrauchssteigerung,
c) Irregularitäten und dynamische Herzinsuffizienz.

12. Die Wirkung kleiner Sympatoldosen entspricht der assimilatorischen Steuerungsphase des Sympathicus und besteht neben der Sauerstoffsparwirkung in einer Förderung der Zuckerassimilation.

Aus der 4. Med. Universitätsklinik Berlin-Moabit (Robert Koch-Krankenhaus). (Direktor: Prof. Dennig.)

Über die Verträglichkeit größerer intravenöser Natriumcitratgaben.

Von

A. Krautwald und **H. Dorow.**

(Eingegangen am 10. Februar 1940.)

I.

Versuche mit Natriumcitrat-Infusionen als Antidot bei Vergiftung durch intravenöse Calciumchloridgaben (1) sowie die Beschäftigung mit dem Problem der wirksamen Form des Calciums (2) führten zu weiteren Untersuchungen über die Wirkungsweise des Natriumcitrats nach intravenöser Zufuhr. Die Kenntnis der Arbeiten Hastings und Mitarbeiter (3) über die Bildung des löslichen Komplexsalzes Ca-Citrat bei Gegenwart von Na-Citrat und Calciumchlorid legte die Vermutung nahe, daß durch genügend große intravenöse Natriumcitratgaben am Menschen bei gleichbleibendem Gesamtcalciumspiegel Calciummangelerscheinungen infolge Verminderung des ionisierten Calciums auftreten. Untersuchungen über die Wirkungsweise großer Natriumcitratgaben schienen uns auch, abgesehen von einem Beitrag zur Beweisführung der ausschließlichen Bedeutung des Calciumions bei der Calciumwirkung durch diese Arbeit im Hinblick auf die vielfache Verwendung des Natriumcitrats zu Bluttransfusionen von Wichtigkeit.

Gordonoff und Mitarbeiter (4) haben darauf hingewiesen, daß kleine Natriumcitratgaben am isolierten Ratten- und Kaninchendarm eine Tonussteigerung und intravenöse Injektionen von mehr als 150 mg/kg beim Kaninchen Dyspnoe, Muskelkrämpfe und Diarrhöen hervorrufen. Minot und Mitarbeiter (5) haben das Auftreten tetanieartiger Störungen nach Citratblutzufuhr bei Hunden mit herabgesetztem Calciumgehalt des Blutes nach Parathyreoidektomie, Guanidinvergiftung oder vorheriger Natriumbicarbonat-Infusion beschrieben und warnen vor Transfusionen von Citratblut bei Kindern, bei denen eine Verminderung des ionisierten Calciums zu vermuten ist. L. Panisset und J. Verge (6) haben bei großen Haustieren Vergiftungserscheinungen durch große intravenöse Na-Citratgaben nach Art einer Taumellähmung mit zeitweiliger Exzitation beobachtet, als deren Ursache eine Entionisierung des Calciums angenommen wird. Beim Kaninchen wurden von K. Mulli und Fr. Standenath (7) nach 7%iger Natriumcitratzufuhr Krämpfe beschrieben bei gleichzeitiger Erhöhung des Calciumspiegels. Über das Auftreten tetanieähnlicher Erscheinungen oder Vergiftungssymptome irgendwelcher Art nach intra

venöser Na-Citratzufuhr beim Menschen bestehen in der Literatur u. W. keine Mitteilungen.

II.

An 25 gesunden Versuchspersonen mittleren Alters wurde die Wirkung von Na-Citrat-Infusionen verschieden hoher Dosen und Konzentrationen geprüft und die von der Infusionsgeschwindigkeit abhängigen Wirkungsunterschiede beobachtet. Nach einer kurzen Ruheperiode von etwa 15 Minuten, während der die Elektroden zur EKG-Aufzeichnung (Extremitätenableitungen) sowie Blutdruckmanschette angelegt wurden, erfolgte die Aufzeichnung des Ruhe-EKGs mit der Apparatur von Hellige. Nachdem Ruhepuls, Atmungsfrequenz und Blutdruck festgestellt waren, wurde durch Venenpunktionen für die Calciumbestimmung im Serum und in einigen Versuchen zur Ermittlung der Alkalireserve Blut entnommen. Mittels eines graduierten Einlaufgefäßes oder Rekordspritzen erfolgte dann unter Zeitkontrolle die Infusion der Na-Citratlösung. Verwendet wurden 3,8- und 10%ige Lösungen des tertiären Natriumcitrats. In verschiedenen Intervallen während und nach Beendigung des Versuchs wurden Elektrokardiogramme, Puls- und Atmungsfrequenz, Blutdruck, Auslösbarkeit des Chvostek- und Trousseauschen Zeichens registriert und Blut zur Ca- und CO_2-Analyse entnommen, sowie Veränderungen des Allgemeinbefindens beobachtet. Die Bestimmung des Calciums im Serum erfolgte nach der Methode von Kramer und Tisdall (8), die Alkalireserve wurde nach van Slyke (9) ermittelt. Bei allen Analysen wurden Doppelbestimmungen ausgeführt.

III.

1. Infusion 3,8%iger Na-Citratlösung.

In 8 Versuchen, in denen 20, 40, 60, 80 oder 100 ccm einer 3,8%igen Na-Citratlösung intravenös in Zeiträumen von 4 10 Min. gegeben wurden, zeigte sich, daß Natriumcitrat in weitaus größeren Mengen als es bei Bluttransfusionen üblich ist, selbst bei einer relativ geringen Infusionsdauer

Tabelle 1. Infusion 3,8%iger Na-Citratlösung.

Versuch Nr.	Injektion 3,8%iger Na-Citratl. in ccm	Infusionsdauer in Min.	Calcium im Serum in mg% vor Versuchsbeginn	Ca in mg%	Min. nach Beginn der Infusion	Ca in mg%	Min. nach Infusionsende
1	20	5	10,8	10,3	8	10,2	25
2	40	7	9,9	—	—	10,0	1
3	60	6	—	—	—	—	—
4	80	10	9,7	—	—	9,8	1
5	100	4	10,2	—	—	9,9	5
6	100	8	10,1	10,3	4	9,8	8
7	100	4	—	—	—	—	—
8	100	10	9,8	9,7	5	9,9	10

von 4 Min. reaktionslos vertragen wird. Die Reflexerregbarkeit und subjektives Befinden blieben unverändert. Atmungsfrequenz, Blutdruck und Calciumspiegel (s. Tabelle 1) sowie EKG-Befunde zeigten ebenfalls keine Veränderungen. Lediglich bei Infusionen von 100 ccm 3,8%iger Na-Citratlösung innerhalb eines Zeitraumes bis zu 5 Min. schilderten die Patienten auf Befragen nach wahrgenommenen Veränderungen ein geringgradiges taubes Gefühl in den Lippen. Chvostek und Trousseausches Zeichen waren nicht auslösbar. Bei keiner der Versuchspersonen traten nach dem Versuch und an den darauffolgenden Tagen Temperaturerhöhungen auf.

2. Infusion 10%iger Na-Citratlösung.

Zur Wirksamkeitsprüfung hypertonischer Na-Citratlösungen wurden in 17 Versuchen Mengen von 2—8 g in 10%iger Lösung innerhalb von 4—40 Min. intravenös zugeführt. Aus Tabelle 2 sind die in den einzelnen Versuchen verwandten Citratmengen sowie die Infusionsdauer ersichtlich.

Nach Infusion 10%iger Lösungen traten regelmäßig Symptome auf, deren Intensität von der zugeführten Menge und der Infusionsgeschwindigkeit abhingen. Schon Injektionen von insgesamt 2 g riefen während der Injektion ein kribbelndes Gefühl in den Fingerspitzen, der Zunge sowie ein Gefühl der Steifigkeit in den Lippen hervor. In Versuch 10 wurde von einem jungen Kollegen als erstes Zeichen nach Zufuhr von 0,8 g Trockenheit des Rachens und nach 1,4 g ein Kribbeln in der Zunge und in den Fingern sowie als vorherrschendes Symptom ein Spannungsgefühl in den Lippen angegeben. Nach Infusion von 2 g war das Chvosteksche Zeichen schwach positiv. Erst 3 Min. nach Beendigung der 5 Min. dauernden Infusion gingen die subjektiven Erscheinungen zurück.

Nach Infusion von 4,8 g einer 10%igen Na-Citratlösung innerhalb von 9 Min. (Versuch 11) traten die oben geschilderten Symptome noch eindrucksvoller und intensiver auf. Nach Injektion von 3 g an war das Chvostek- und Trousseausche Zeichen positiv und noch 2 Min. lang nach Beendigung des Versuchs auslösbar.

In den Versuchen 12 und 13 zeigte sich, daß die Infusionsgeschwindigkeit für Art und Intensität der Wirkung bei gleicher Dosis aber verschiedener Infusionsdauer entscheidend ist. 5 g Na-Citrat, die innerhalb von 15 Min. zugeführt wurden, waren in ihrer Wirkung einer Gabe von nur etwa 2 g zu vergleichen, die innerhalb von 5 Min. injiziert worden waren. Die Abhängigkeit der Wirkung von der Infusionsgeschwindigkeit war weiterhin besonders aus Versuchen 17, 18 und 19 ersichtlich. Wurde die Zufuhr von Na-Citrat bis zu 8 g über längere Zeit hin protrahiert, so war die Qualität der Reaktionen zwar die gleiche wie bei Zufuhr der gleichen Dosis innerhalb kurzer Zeit, die Intensität der tetanischen Erscheinungen jedoch im Verhältnis zur Infusionsdauer abgeschwächt. Aus den langfristigen Ver

Tabelle 2. Calcium im Serum und Alkalireserve im Blute vor, während und nach Infusion 10%iger Natriumcitratlösung.

Versuch Nr.	Infusion 10%iger Natriumcitratlösung in g	Infusionsdauer in Min.	**Ca vor** Versuchsbeginn in mg%	**Ca während** der Infusion in mg%	Minuten nach Infusionsbeginn	**Ca nach** Beendigung der Infusion: in mg%	Min. nach Infusionsende	in mg%	Min. nach Infusionsende	in mg%	Min. nach Infusionsende	CO_2 in Vol.%: vor Infusionsbeginn		nach Infusionsende	
9 S.	2,0	4	**10,2**	—	—	**10,3**	3	—	—	—	—	—	—	—	—
10 G.	2,0	5	**10,6**	—	—	**10,2**	8	**10,4**	12	**10,7**	22	—	—	—	—
11 W.	4,8	9	**9,5**	—	—	**9,6**	1	**9,9**	6	**10,0**	9	49,2	49,4	48,9	49,3
12 H.	5,0	15	**9,8**	—	—	**10,0**	1	**9,6**	15	—	—	—	—	—	—
13 B.	5,0	5	**10,2**	—	—	**9,9**	1	**10,1**	9	**10,1**	40	—	—	—	—
14 G.	5,9	34	**9,1**	**9,3**	17	**10,0**	1	—	—	—	—	47,5	47,1	48,7	48,0
15 B.	6,0	11	**10,8**	—	—	**10,4**	2	—	—	—	—	—	—	—	—
16 S.	6,0	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17 A.	7,0	40	**9,3**	**9,1**	24	**9,5**	1	—	—	—	—	—	—	—	—
18 G.	7,6	16	**10,8**	**10,9**	7	**10,8**	1	—	—	—	—	—	—	—	—
19 K.	7,8	26	**10,8**	**9,9**	16	**8,9**	1	—	—	—	—	—	—	—	—
20 P.	8,0	10	**9,4**	**9,7**	5	**10,1**	1	**8,9**	4	—	—	46,5	46,9	45,8	46,3
21 K.	8,0	11	**10,5**	**10,7**	7	**10,5**	1	—	—	—	—	—	—	—	—
22 D.	8,0	6	**9,9**	—	—	**10,2**	1	**9,5**	4	—	—	55,1	54,8	55,3	54,8
23 J.	8,0	4	**8,5**	—	—	**9,6**	1	—	—	—	—	47,3	47,5	47,8	48,5
24 B.	8,0	12	**8,8**	**9,9**	7	**10,1**	1	—	—	—	—	52,3	50,0	52,8	50,4
25 S.	8,0	7	**10,0**	—	—	**10,8**	1	—	—	—	—	51,7	52,8	50,7	51,8

suchen 17 –19 ging hervor, daß die zugeführten Citratmengen schadlos hätten noch weiterhin erhöht werden können.

Um sicherzustellen, daß die Wirkung großer Mengen 10%iger Citratlösung nicht so sehr von der Dosis der zugeführten Substanz als vielmehr von der Infusionsgeschwindigkeit abhängt, wurde in 2 Versuchen innerhalb weniger Minuten eine relativ große Dosis Na-Citrat stoßweise verabreicht. Im Fall 21 wurden innerhalb von 11 Min. fraktioniert insgesamt 8 g Na-Citrat zugeführt (s. Tabelle 3). Nach rascher Injektion der letzten beiden Fraktionen von je 2 g sowie nach stoßweiser Injektion von Na-Citrat in Versuch 20 traten jedesmal schwere tetanische Anfälle auf, während aus vorhergehenden Versuchen bekannt war, daß Injektionen von 2 g innerhalb von 5 Min. höchstens eine leichte neuromuskuläre Übererregbarkeit hervorrufen. Voraussetzung für das Auftreten eines tetanischen Anfalls nach stoßweiser Citratgabe war, daß etwa zwei Drittel der Gesamtmenge bereits zugeführt und weitere 2 g auch nach kurzen Pausen innerhalb von 1 bis $1^1/_2$ Min. injiziert wurden.

Tabelle 3. Versuch 21.

Na-Zitratzufuhr in g	Infusionsdauer in Min.
4,0	3′ 40″
3′ 45″ Pause	
2,0	70″
1′ 35″ Pause	
2,0	50″

In sehr eindrucksvoller Weise traten in den Versuchen 22, 23 und 25 die Wirkungen großer intravenöser Natriumcitratgaben in Erscheinung. Es wurden in diesen Versuchen insgesamt 8 g innerhalb von 4, 6 und 7 Min.

injiziert. Schon 1 Min. nach Infusionsbeginn traten ein taubes, steifes Gefühl in den Fingern, in den Lippen und ein Spannungsgefühl im Hals und in der Brust auf. Chvostek- und Trousseausches Zeichen waren in diesen Versuchen mit nur geringer Infusionsdauer erst nach Zuführung von 3—4 g, also etwa 2 Min. nach Beginn der Infusion, positiv. Die Versuchspersonen empfanden am quälendsten die während der Infusion immer mehr zunehmende Steifigkeit in der Muskulatur unter vorwiegender Beteiligung der Kau-, Lippen- und Extremitätenmuskulatur. Bei einigen Versuchspersonen wurde ein Knirschen mit den Zähnen infolge eines tonischen Krampfes der Kaumuskulatur beobachtet. Sämtliche Erscheinungen gingen spätestens 10 Min. nach Beendigung der Infusion wieder zurück.

Es konnte demnach gezeigt werden, daß intravenöse Zufuhr 10%iger Citratlösungen in Mengen über 5 g innerhalb von Zeiträumen bis zu 15 Min. Erscheinungen hervorrufen, die dem Symptomenbild der Tetanie zuzuordnen sind.

In Versuch 23 erzeugten innerhalb von 4 Min. injizierte 8 g bei einem jungen kräftigen Manne schwere tetanische Reaktionen mit beginnender Bewußtseinstrübung. Die Erscheinungen gingen jedoch innerhalb 1 Min. zurück, bevor noch mit einer Ca-Chlorid-Injektion begonnen wurde. Der tetanische Zustand mit allgemeiner Reflexsteigerung, positiven Chvostek- und Trousseauschen Zeichen hielt noch etwa 3 Min. lang nach Infusionsbeendigung an. Die Versuchsperson gab nachher an, daß sie außer dem Krampfgefühl den Eindruck hatte, narkotisiert worden zu sein. Versuch 22 mit Zufuhr von 8,0 g innerhalb von 6 Min. zeitigte ein ähnliches Ergebnis.

Im Hinblick auf die Schwere der Erscheinungen wurde von einer mengenmäßigen Steigerung der Citratzufuhr sowie von einer weiteren Verkürzung der Infusionsdauer Abstand genommen, ganz besonders, nachdem in Versuch 16 schon durch Injektion einer Dosis von 6 g mit einer Infusionsdauer von 5 Min. ein bedrohlicher Zustand mit schwerer tetanischer Reaktion, Schreikrämpfen und Bewußtseinstrübung aufgetreten war. Die tetanischen Erscheinungen konnten jedoch augenblicklich durch Injektion von 10 ccm einer 10%igen Calciumchloridlösung beseitigt werden. Die Versuchsperson schilderte später in glaubhafter Weise ihre Empfindungen während der Infusion. Außer den von allen Versuchspersonen nach Zufuhr großer Citratgaben beschriebenen Erscheinungen wurde angegeben, daß willkürliche Bewegungen nicht mehr ausgeführt werden konnten; obwohl sie über die Vorgänge in der Umgebung auch während der Infusion orientiert war und jede Aufforderung verstand, war sie nicht in der Lage, die Augen zu öffnen oder die Zunge zu bewegen. Dieser Zustand der Reaktionslosigkeit hat schätzungsweise 1 Min. bis zur Ca-Chlorid-Injektion gedauert. Während des tetanischen Anfalls waren Chvostek und Trousseau stark positiv, Patellar-, Achilles- sowie Radiusperiostreflexe gesteigert.

Zur Klärung des Entstehungsmechanismus der Tetanie durch intravenöse Citratgaben wurden zu den verschiedensten Zeiten vor, während

und nach der Infusion Blutproben zur Calciumanalyse entnommen. Ein Vergleich des Ca-Gehalts im Serum (s. Tabelle 2) zu den verschiedensten Zeitpunkten während des Versuchs ergibt, daß das Zustandekommen der tetanischen Erscheinungen nicht durch ein Absinken des Gesamtcalciums im Serum verursacht wird. Lediglich in Versuchen 19 und 20 war eine nennenswerte Veränderung des Ca-Gehalts im Serum aufgetreten. In beiden Fällen waren jedoch zur Zeit der Blutentnahme die Allgemeinerscheinungen nur gering oder (wie im Versuch 20) schon längere Zeit abgeklungen und keine Symptome mehr wahrzunehmen, die auf eine erhebliche Veränderung des Gesamtcalciums hingewiesen hätten. Gerade durch Versuch 19 wurde der Eindruck gewonnen, daß. über lange Zeit hin protrahiert, noch weiterhin große Citratmengen hätten zugeführt werden können. Die geringfügigen Schwankungen in den Calciumwerten sind vor allem im Hinblick auf die in einigen Versuchen zugeführten großen Dosen innerhalb sehr kurzer Zeiten auffallend (s. Versuche 18 -25). Eine Reihe von Blutproben sind zu dem Zeitpunkt entnommen. in dem die tetanischen Erscheinungen am ausgeprägtesten waren. Auch in diesen Fällen wurde eine Calciumverminderung nicht gefunden.

Durch Zufuhr großer Citratmengen war eine Änderung der Blutreaktion in alkalischer Richtung vorstellbar. Fraglich war jedoch im Hinblick auf die Arbeit von Holt und Mitarbeitern, ob eine eventuell durch Natriumcitratzufuhr entstehende Alkalose das Auftreten einer Tetanie hinreichend erklären konnte. Holt (10) hatte selbst bei einer Alkalose nach Infusion von NaOH und KOH, die größer als nach Natriumbicarbonatzufuhr war, an Hunden keine Tetanie hervorrufen können. Wir haben in einer Reihe von Versuchen (Tabelle 2) eine eventuell auftretende alkalotische Stoffwechselrichtung durch Bestimmung des Pufferungsvermögens des Blutes in der einfachsten Anordnung durch Bestimmung der Alkalireserve bei gleichbleibender CO_2-Spannung gemessen. Die aus Tabelle 2 ersichtlichen Werte für die Alkalireserve in Vol.% CO_2 machen jedoch eine das Auftreten der Tetanie erklärende Änderung der Stoffwechsellage in Richtung einer Alkalose unwahrscheinlich.

Die Betrachtung von Tabelle 4, in der Atmungsfrequenz und Blutdruckwerte vor, während und nach der Citratinfusion eingezeichnet sind, ergibt, daß die Tetanie nicht als Folge einer beschleunigten und vertieften Atmung aufzufassen ist.

Als Maximum wurde eine Atemfrequenzerhöhung von 6 pro Minute beobachtet. Nur in Fall 21 trat bei einer leicht erregbaren, nervösen Versuchsperson eine gleich nach Beginn der Infusion einsetzende Beschleunigung der Atmung um 24 pro Min. auf, die noch etwa 10 Min. lang nach dem Versuch bestehen blieb. Wir hatten besonders im Vergleich zu allen anderen Versuchen den Eindruck, daß diese nur einmalig beobachtete Atemfrequenzerhöhung nicht auf die Natriumcitratinfusion zurückzuführen war. Die mit der Versuchsanordnung zusammenhängenden Hand-

Tabelle 4. Atmungsfrequenz und Blutdruckwerte nach Na-Citratzufuhr.

Versuch Nr.	Vor Infusion		Während Infusion			Nach Infusion	
	Atmung pro Min.	Blutdruck in mm Hg	nach Injektion von Na-Citrat in g	Atmung pro Min.	Blutdruck in mm Hg	Atmung pro Min.	Blutdruck in mm Hg
11	16	130/65	2,0	18	—	22	130/85
14	18	100/65	3,5	18	105/65	18	100/68
15	18	105/70	4,0	21	130/80	21	130/80
16	24	130/80	5,0	20	125/80	24	—
17	16	115/75	4,8	15	118/75	16	115/75
18	18	130/75	4,5	20	135/80	16	130/80
19	16	105/70	4,7	13	—	13	105/60
20	19	120/80	6,0	19	120/80	20	120/75
21	16	110/65	4,0	40	120/70	42	130/75
22	26	120/70	6,0	20	125/70	20	115/75
23	20	105/50	6,0	20	105/50	18	105/50
24	24	130/90	6,0	25	—	28	140/100
25	24	140/90	4,0	27	145/90	26	135/85

habungen, die Infusion sowie die mehrmaligen Blutentnahmen, lösten bei dieser Person einen allgemeinen Erregungszustand mit Schweißausbruch und Atmungsbeschleunigung aus, noch bevor hinreichende Citratmengen injiziert waren. Eine Vertiefung der Atmung, insbesondere des Exspiriums, die eine Tetanie hätte auslösen können, wurde sonst in keinem Versuch beobachtet. Aus Tabelle 4 sind ebenfalls die Blutdruckwerte während und nach der Citratinfusion zu ersehen, die wir wegen der in der Literatur vorhandenen widersprechenden Angaben registrierten. Eine wesentliche Beeinflussung der systolischen und diastolischen Werte wurde nicht beobachtet.

Auch nach Infusion 10%iger Na-Citratlösungen wurden Temperaturerhöhungen sowie Spätschäden bei den Versuchspersonen nicht beobachtet.

Die Auswertung der zu verschiedensten Zeiten während und nach der Infusion aufgenommenen Elektrokardiogramme ergab keine Störungen in der Vorhofkammerüberleitung, keine Veränderung des QRS-Komplexes und der Form der Nachschwankung. Eine Senkung des ST-Stückes als Zeichen vorübergehender Koronarinsuffizienz war in keinem Falle nachzuweisen. Die Änderung der Schlagfrequenz ist aus Tabelle 5 zu ersehen, in der auszugsweise in tabellarischer Übersicht außer Schlagintervallzeit und Frequenz pro Minute, die Zeiten für QT angegeben sind. Außerdem sind die nach der Bazettschen Formel: $QT = 0{,}39 \cdot \sqrt{\text{Schlagintervall}}$ errechneten Zeiten für QT eingetragen. Bei Vergleich der gemessenen Zeiten mit den nach Bazett errechneten Werten für QT fällt auf, daß mit Ausnahme von Versuch 22 in allen untersuchten Fällen nach Citratzufuhr in Mengen über 7.0 g eine Verlängerung der QT-Zeit vorhanden ist. Die Werte für QT sind auch nach Berücksichtigung der für Bazett in Frage kommenden Fehlerbreite von 0.04 Sek. zum Teil erheblich vergrößert. Eine Verlängerung des QT-Stückes war, allerdings nicht regelmäßig, schon nach Zufuhr von 4.0 Na-Citrat zu beobachten. Durchschnittlich sind

Tabelle 5. Schlagfrequenz, QT in Sekunden aus Elektrokardiogram
QT n

Versuch Nr.	I. EKG vor Infusion				II. EKG während der Infusion				
	P–P	Frequenz pro Min.	QT gemessen in Sek.	QT nach Bazett	nach Citratzufuhr in g	P–P	Frequenz pro Min.	QT gemessen in Sek.	Q na Baz
11	0,75	80	0,35	0,33	—	—	—	—	–
12	1,1	56	0,40	0,40	—	—	—	—	–
15	0,95	63	0,38	0,38	4,0	0,7	86	0,38	0,3
16	0,7	86	0,34	0,32	—	—	—	—	–
17	1,05	57	0,40	0,39	4,8	1,0	60	0,40	0,3
18	0,95	63	0,40	0,38	6,0	0,72	83	0,40	0,3
19	1,0	60	0,40	0,39	5,0	0,75	80	0,40	0,3
20	0,9	67	0,39	0,37	—	—	—	—	–
21	1,1	54	0,44	0,40	—	—	—	—	–
22	0,8	75	0,35	0,34	—	—	—	—	–
23	1,1	54	0,38	0,40	—	—	—	—	–
24	1,1	54	0,41	0,40	3,0	1,05	57	0,41	0,3
25	0,75	80	0,34	0,33	6,0	0,75	80	0,38	0,3

die Werte für QT 5 Min. nach Beendigung der Infusion wieder normal. Nur im Versuch 19, in dem eine psychogene Atmungsbeschleunigung auftrat, war noch 9 Min. nach Infusionsbeendigung QT verlängert. Diese Verlängerung von QT als Zeichen eines akuten Calciummangels, wie sie bei allen Formen echter Tetanie nach Nebenschilddrüsenexstirpation zu finden ist, war mit der Schwere der tetanischen Anfälle und der Höhe der zugeführten Natriumcitratdosis nicht in gesetzmäßigen Zusammenhang zu bringen.

IV.

In Versuchen am Menschen konnte gezeigt werden, daß Infusion 10%iger Na-Citratlösung Erscheinungen einer neuromuskulären Überregbarkeit mit tonischem Krampf der Lippen- und Extremitätenmuskulatur verursachen, wie sie für das Symptomenbild der Tetanie charakteristisch sind. Auch die im EKG nachweisbare Verlängerung des QT-Stückes nach intravenöser Na-Citratzufuhr als Ausdruck eines akuten Calciummangels sprach für die Entstehung einer echten Tetanie. In Analogie zu Versuchen, in denen durch intravenöse Na-Oxalatgaben (11. 12, 13) eine Tetanie mit Verminderung des Gesamtcalciums verursacht wurde, erwarteten wir anfangs durch Natriumcitratinfusionen ebenfalls ein Absinken des Calciumspiegels unter einen zur Erhaltung einer normalen Erregbarkeit erforderlichen Schwellenwert.

Sämtliche Calciumanalysen zeigten jedoch keine das Auftreten einer Tetanie hinreichend erklärende Verminderung des Gesamtcalciums durch Na-Citratzufuhr.

Da die Atmungsfrequenz mit Ausnahme eines Versuchs praktisch unverändert blieb, kam für eine Deutung der Entstehungsursache der Tetanie eine Alkalose durch Hyperventilation (14) mit gleichbleibendem Calciumspiegel aber gleichzeitiger Ca-Ionenverschiebung nicht in Frage.

während und nach Infusion 10%iger Natriumcitratlösung sowie ett.

	III. EKG 1 Min. nach Infusion					IV. EKG ... Min. nach Infusion				
ch tzu- in g	Infusi- onsdauer in Min.	P—P	Frequenz pro Min.	QT gemessen in Sek.	QT nach Bazett	Min. nach Infusion	P-P	Frequenz pro Min.	QT gemessen in Sek.	QT nach Bazett
8	9	0,7	86	0,35	0,32	21	0,7	86	0,35	0,32
0	15	1,15	52	0,40	0,40	15	1,15	52	0,40	0,40
0	11	—	—	—	—	6	0,8	75	0,38	0.34
0	5	0,6	100	0,34	0,30	13	0,65	92	0,34	0,31
0	40	0,85	70	0,40	0,36	8	1,2	50	0,40	0,42
6	16	0,72	83	0,40	0,33	10	0,85	70	0,40	0,36
8	26	0,75	80	0,40	0,33	9	0,75	80	0,40	0,33
0	10	—	—	—	—	8	0,8	75	0,39	0,35
0	11	0,62	96	0,45	0,30	4	1,5	40	0,45	0,47
0	6	0,75	80	0,35	0,33	5	0,8	75	0,35	0,33
0	4	0,75	80	0,38	0,33	15	1,1	54	0,39	0,40
0	12	0,65	92	0,40	0,31	2	0,7	86	0,40	0,32
0	7	0,7	86	0,38	0,32	—	—	—	—	

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen haben Salant und Kleitman (15) an Katzen und Kaninchen nach intravenöser Citratzufuhr eine Atembeschleunigung beschrieben. Christ (16) dagegen berichtet von einer ausbleibenden Reaktion der Atmung nach Citratinjektionen.

Die Angaben über die Beeinflussung des Blutdrucks durch Na-Citrat in der Literatur sind widersprechend. Christ (16) sah nach Injektion hypertonischer Lösungen beim Hund nur geringfügige Schwankungen, während von Gordonoff (4), Salant und Kleitman (15) und von Love (17) vorübergehende Blutdrucksenkungen angegeben werden.

Eine Beeinflussung des EKGs durch intravenöse Citratgaben sind u.W. bisher nicht bekannt.

Von Hastings (3) und von Peretti (18) wurde bei Gegenwart von Natriumcitrat und Calcium auf die Bildung eines in Lösung bleibenden komplexgebundenen Ca-Citrats hingewiesen. Diese vorübergehende Bildung eines löslichen Ca-Citrats in vivo nach Na-Citratzufuhr ist unserer Ansicht nach für das Auftreten der Tetanie verantwortlich zu machen. Infolge vorübergehender bis zur Einsetzung der Verbrennung des Citratrestes dauernder Inaktivierung des ionisierten Calciums tritt bei gleichbleibendem Gesamtcalcium ein akuter Mangel an Calciumionen mit allen für eine Ca-Verarmung charakteristischen Erscheinungen auf.

Auf Grund unserer Analysenwerte für die Alkalireserve war die Annahme einer wesentlichen Änderung des Stoffwechsels in alkalischer Richtung nicht wahrscheinlich. Eine sichere Beurteilung der tatsächlichen Reaktion des Blutes ist jedoch nur durch Bestimmung der Alkalireserve nicht möglich. H. Dennig (19) und Mitarbeiter haben durch große perorale Natriumcitratgaben eine Änderung des Stoffwechsels in alkalischer Richtung beobachten können, wie sie durch intravenöse Gaben sicher nicht zu erzielen ist.

Ein Nachweis der Entionisierung des Calciums bei gleichbleibendem Calciumspiegel nach Citratzufuhr mit der Methode der Ca-Ionenbestimmung von Harnap (20) sowie Messungen des p_H im Blute bleiben im Zusammenhang mit Untersuchungen über die gerinnungsfördernde Wirkung des Na-Citrats in vivo einer späteren Arbeit vorbehalten.

Zusammenfassung.

1. Na-Citratinfusionen 3,8%iger Lösung werden bis zu 100 ccm vom Menschen auch bei geringer Infusionsdauer reaktionslos vertragen.

2. Infusion 10%iger Na-Citratlösung verursacht in Mengen über 5 g eine Tetanie, die hinsichtlich der Intensität der Erscheinungen von der Dosis und der Infusionsgeschwindigkeit abhängt.

3. Der Gesamtcalciumspiegel bleibt selbst nach Zufuhr von 8 g Na-Citrat innerhalb von 5 Min. unverändert.

4. Die Alkalireserve des Blutes wird auch durch große Na-Citratgaben nicht beeinflußt. Die von uns beobachtete Tetanie wird nicht durch eine Hyperventilation verursacht.

5. Im EKG war eine für Ca-Mangel charakteristische Verlängerung des QT-Stückes nach intravenöser Na-Citratzufuhr nachweisbar.

6. Wesentliche Veränderungen der Blutdruckwerte nach Citratzufuhr traten nicht auf.

7. Bei keiner der 25 Versuchspersonen wurde nach der Infusion eine Temperaturerhöhung beobachtet.

8. Das Symptomenbild der Tetanie nach Infusion großer Na-Citratmengen wird verursacht durch eine zeitweilige Inaktivierung des ionisierten Calciums des Blutes infolge Bildung des löslichen Komplexsalzes Ca-Citrat.

9. Injektion von Calciumchlorat beseitigt augenblicklich die Folgeerscheinungen intravenöser Na-Citratgaben.

Literatur.

1) Heubner, W., A. Krautwald u. M. Stuhlmann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 1. — 2) Krautwald, A., u. M. Stuhlmann: Ebenda **188**, 152. — 3) Hastings, A. Baird, Franklin C. Mc Lean, Lillian Eichelberger: J. biol. Chem. (Am.) **107**, 351. — 4) Gordonoff, T., O. Schütz u. W. Spycher: Z. exper. Med. **74**, 415. — 5) Minot, A. S., K. Dood u. R. Bryan: Amer. J. Dis. Childr. **45**, 32. — 6) Panisset, L., u. J. Verge: C. r. Soc. Biol. **87**, 224. — 7) Mulli, K., u. Standenath: Klin. Wschr. **1933**, S. 544. — 8) Kramer u. Tisdall: J. biol. Chem. (Am.) **48**, 223. — 9) Peters u. van Slyke: Quant. clinica Chem., New-York 1932. — 10) Holt, Striegel u. Perlzweig: Mschr. Kinderhk. **34**, 437. — 11) Starkenstein, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **77**, 45. — 12) Salant, William, William M. Parkins, L. E. Sheppard: J. Labor. a. clin. Med. (Am.) **19**, 142. — 13) Baudouin, A., J. Lewin u. E. Azérad: C. r. Soc. Biol. **109**, 1265. — 14) Gollwitzer-Meier u. E. C. Meyer: Z. exper. Med. **40**, 70. — 15) Salant, William, u. N. Kleitman: J. Pharmacol. (Am.) **20**, 481; **21**, 214. — 16) Christ, A.: Bruns' Beitr. Klin. Chir. **140**, 465. — 17) Love, G.: J. Labor. a. clin. Med. (Am.) **9**, 175. — 18) Peretti, G.: Arch. Sci. biol. (It.) **17**, 126. — 19) Dennig, H., H. J. Gottschalk u. L. Teutscher: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **174**, 468. — 20) Harnap, G. O.: Klin. Wschr. **1938**, 17, 131.

Mitteilung aus dem Pharmakologischen Institut der ungar. königl. „Tisza István"-Universität in Debrecen. (Direktor: Dr. A. v. Jeney, o. ö. Univ.-Professor.)

Antiheparin-Faktor in der Leber.

Von

A. v. Jeney und T. Vályi-Nagy.

(Eingegangen am 11. Februar 1940.)

Im Laufe von Versuchen in vitro mit auf verschiedene Weise hergestellten Leberauszügen ist einem von uns (v. Jeney) schon früher aufgefallen, daß nach Zugabe des einen Leberauszuges das mit Heparin behandelte Plasma rasch, sehr oft sofort gerinnt und dies besonders dann auf charakteristische Weise erfolgt, wenn zu dem Plasma vorher irgendeine Gewebe- bzw. Zellsuspension zugefügt wird. Nach dieser vorläufigen Beobachtung lohnte es sich, diese Frage näher zu untersuchen.

Herstellung des Leberauszuges.

5 kg frische Schweineleber wurden sorgfältig von den Bindegewebsteilen gereinigt, zerkleinert und durch die Fleischmaschine getrieben. Der Leberbrei wurde in ein größeres Gefäß gebracht und 3000 ccm 25%ige NaOH-Lösung hinzugefügt. Das Gemisch wurde 3 Stunden lang bei 70° C gehalten und fortwährend umgerührt, wobei acht gegeben wurde, daß die stark schäumende Flüssigkeit nicht überläuft. Danach wurde das Gemisch für 2—3 Minuten aufgekocht und sodann der verseifte Teil durch Filtration separiert. Der flüssige Teil wurde 24 Stunden lang im Eisschrank stehengelassen und der noch inzwischen entstandene Niederschlag durch wiederholtes Filtrieren entfernt. Die auf diese Weise gewonnene dunkelbraune kristallklare Lösung wurde mittels 2 n HCl bei Lackmuskontrolle neutralisiert. Um den inzwischen entstandenen Niederschlag zu entfernen, wurde die Lösung filtriert und sodann im Vacuum bei 40° etwa auf $^1/_4$ Teil eingeengt. Zwecks Entfernung der Fettsäuren und Sterine wurde die Lösung mit wasserfreiem Äther viermal nacheinander extrahiert, und zwar wurden auf je 100 ccm Lösung 30—35 ccm Äther gerechnet. Die Ätherauszüge wurden verschüttet und die wässerige Fraktion im weiteren auf folgende Weise bearbeitet. Zwecks Entfernung der großen Menge der Elektrolyten kam die Lösung in Dialysierungshülsen und wurde im Eisschrank bei häufigem Wechseln der äußeren Flüssigkeit so lange dialysiert, bis die aus dem äußeren Raum entnommene Flüssigkeitsprobe kein NaCl mehr enthielt (d. h. mit $AgNO_3$ keinen Niederschlag ergab). Dies erfolgte meistens nach 26—40stündiger Dialysierung. Um die letzten Spuren der Elektrolyten zu entfernen, wurde in mehreren Fällen auch Elektrodialyse angewendet.

Meistens gelang uns schon mittels einfacher Dialyse, einen elektrolytarmen Leberextrakt herzustellen. Nach der Dialyse wurde die Flüssigkeit im Vakuum bei 40° eingetrocknet. Der eingetrocknete Leberauszug ist ein eigenartig riechender, amorpher, dunkelbrauner, pulverartiger, ziemlich hygroskopischer Stoff, enthält aber einen in Wasser unlöslichen Teil, welcher in der Wasserlösung ein braun-schwarzes Sediment bildet. Der Leberauszug ist in Wasser bis zu einer Konzentration von etwa 1% und in 0,9%iger NaCl-Lösung bis 5—6% löslich. Die auf diese Weise gewonnene Lösung reagiert neutral, gibt starke Biuret-Reaktion und schwache Mollisch-Udránszky-Reaktion.

Blutgerinnungsversuche.

A. Methodik.

Die Blutgerinnungsbestimmungen wurden nach der von Albert Fischer (11) vorgeschriebenen Methode und Instrument im allgemeinen in einer Gesamtflüssigkeit von 0,3 ccm bis 0,4—0,5 ccm ausgeführt. Das Kaninchenblut wurde zu jeder Versuchsreihe frisch aus der Carotis entnommen, in eisgekühlten mit Paraffin beschickten Zentrifugenröhrchen aufgefangen, und zwar in jedes Röhrchen 10 ccm. Die Wand jedes Paraffinröhrchens wurde vorher mit 2 mg Heparin bestreut (Heparinkonzentration: 0,02%). Aus den Organen der entbluteten Tiere wurden die Gewebesuspensionen hergestellt. Die Gewebesuspension (1,5%) und die Leberauszüge (0,5%) wurden mit NaCl-Lösung verdünnt. Die Röhrchen wurden mit einem mittels in Ringerlösung aufgeweichtem Pergamentpapier bedeckten Gummideckel fest verschlossen. Das verschlossene Metallgestell wurde in ein gläsernes Wasserbad von 37° gestellt, so daß es gut sichtbar und bequem gedreht werden konnte. Das Gestell wurde minütlich viermal gedreht und die Gerinnungszeit aufgezeichnet.

B. Versuchsergebnisse.

I. Die Gerinnungszeit des Heparin-Kaninchenplasmas in Anwesenheit von homologen Zellsuspensionen auf Wirkung des Leberauszuges oder ohne desselben.

Nach Zugabe von verschiedenen Gewebesuspensionen geronn das Heparin-Kaninchenplasma nach verschieden langer Zeit (s. Tabelle 1). In kürzester Zeit geronn es in Anwesenheit der Milz-, Lymphdrüsen-, Herzmuskel-, Nieren-, Lungenzellsuspensionen. Besonders kurz war die Gerinnungszeit auf Wirkung der Milz (im Mittelwert 29 Sek.). Auf Wirkung des Gehirngewebes und Skeletmuskels wurde die Gerinnungszeit etwas länger (2 Min. bis 2 Min. 08 Sek.). Außerordentlich auffallend war die Verlängerung der Gerinnungszeit des Heparin-Kaninchenplasmas nach Zugabe von Knochenmarksuspension (im Mittelwert 9 Min. 31 Sek.).

Tabelle 1. Gerinnungszeit des Heparinplasmas von Kaninchen in Anwesenheit von homologen Zellsuspensionen mit und ohne Zugabe von Leberextrakt.

	Zellsuspension (1,5%) aus Kaninchenorganen in 0,9% NaCl ccm	Heparinplasma (0,02%) von Kaninchen ccm	Leberextrakt (0,5%) in 0,9% NaCl ccm	0,9% NaCl ccm	Gerinnungszeit (Mittelwert)	Verkürzung der Gerinnungszeit (Mittelwert)	Zahl der Versuche
1. Knochenmark	0,1	0,1	—	0,1	9′ 31″	4′ 17″	61
	0,1	0,1	0,1	—	5 14		66
2. Gehirn	0,1	0,1	—	0,1	2 0	0 40	9
	0,1	0,1	0,1	—	1 20		9
3. Lymphknoten	0,1	0,1	—	0,1	1 02	1 02	7
	0,1	0,1	0,1	—	sofort		7
4. Herzmuskel	0,1	0,1	—	0,1	1′ 15″	1 09	7
	0,1	0,1	0,1	—	0 6		4
5. Niere	0,1	0,1	—	0,1	1 31		9
6. Milz	0,1	0,1	—	0,1	0 29		6
7. Lunge	0,1	0,1	—	0,1	1 43		4
8. Skeletmuskulatur	0,1	0,1	—	0,1	2 08		4

Durch 0,1 ccm 0,5%igen Leberextrakt wurde der Gerinnungsprozeß in jedem Falle außerordentlich beschleunigt. In Anwesenheit von Lymphdrüsen- und Herzmuskelsuspension erfolgte die Gerinnung des Heparin-Kaninchenplasmas in solchem Falle sozusagen augenblicklich. Durch die Milz wurde der Gerinnungsprozeß schon derart beschleunigt, daß die Beurteilung der separaten Wirkung des Leberextraktes dadurch erschwert wurde. Zur Beobachtung der Leberextraktwirkung zeigte sich in erster Reihe die Knochenmarksuspension als geeignet, nachdem die Gerinnungszeit des Heparin-Kaninchenplasmas durch dieselbe allein am stärksten verzögert wurde. Der Mittelwert von 66 Versuchen zeigt, daß die Gerinnungszeit des Heparinplasmas in Anwesenheit von Knochenmarksuspension durch den von uns hergestellten Leberauszug fast auf die Hälfte verkürzt wird, indem die Gerinnungszeit von 9 Min 31 Sek. bis auf 5 Min. 14 Sek. herabgesetzt wird, was einer Verminderung von 4 Min. 17 Sek. entspricht. Auch in Anwesenheit von Gehirngewebe ergab die Verminderung der Gerinnungszeit durchschnittlich 40 Sek., im Falle der Lymphdrüsensuspension 1 Min. 02 Sek. und bei Herzmuskelsuspension war sie 1 Min. 9 Sek.

Die Zeitverkürzung konnte auch bei anderen Zellsuspensionen festgestellt werden, dieselbe war aber nicht so auffallend wie im Falle der Knochenmarksuspension.

Es wurde auch untersucht, ob bei Änderung der zugefügten Menge des Leberextraktes, bei übrigens ähnlichen Bedingungen, die Blutgerinnungszeit verändert wird? Falls die Leberextraktkonzentration von 0,1 auf 0,5% gehoben wurde, wurde die Gerinnungszeit in Anwesenheit von Knochenmarksuspension fast um das Zweifache kürzer, d. h. nahm von

5 Min. 38 Sek. auf 2 Min. 30 Sek. ab. Darüber hinaus konnte aber bei stufenweise gesteigerter Leberdosis die Blutgerinnung nicht mehr beschleunigt werden.

Zu dem Zurgeltungkommen des Leberextraktes ist auch die Aktivität der zugefügten Zellsuspension nötig. Dies ist daraus ersichtlich, daß, falls z. B. bei den mit der Lymphdrüsensuspension durchgeführten Versuchen die Gewebesuspension vorher 3 Min. lang bei 100° gehalten wurde und dann zum Heparinplasma zugefügt wurde, die übrigens in 1 Min. 2 Sek. eintretende Gerinnung in 7 Min. 10 Sek. erfolgte. Wenn wir zu solchem mit Wärme behandelter Lymphdrüsensuspension enthaltenden Heparinplasma Leberextrakt hinzufügten, wurde die Gerinnungszeit nur mäßig, um etwa 1 Min. verkürzt (sank anstatt bis 7 Min. 11 Sek. bis auf 6 Min. 11 Sek.).

Falls das Heparinplasma auf das Dreifache verdünnt wurde, erfolgte die Gerinnung nach Zugabe von Knochenmarksuspension durchschnittlich in 12 Min. 41 Sek. (Mittelwert von 9 Versuchen). Bei Zugabe des Leberextraktes wurde diese Zeitdauer lediglich auf 10 Min. 05 Sek. verkürzt (Mittelwert von 6 Versuchen). Falls wir den Leberextrakt nur zu reinem Heparinplasma gaben, war die Gerinnung spätestens in 4 Min. meistens vollkommen, das Plasma erstarrte im Ganzen, war aber manchmal nur sehr dick, es konnten einige Fibrinfäden darin beobachtet werden, aber erstarrte nicht im Ganzen, sondern der flüssige Teil konnte ausgegossen werden.

II. Die Wirkung der intravenösen Verabreichung des Leberextraktes auf die Blutgerinnung.

Bei Injizierung von 1—2 ccm 0,5—1,0%igen Leberextraktes in die Ohrvene eines 2—3 kg schweren gesunden Kaninchens tritt eine intravasculare Gerinnung oder Embolie nicht auf.

III. Die Wirkung von aus anderen Organen hergestellten Auszügen.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurden aus verschiedenen Kaninchenorganen Auszüge hergestellt und die Wirkung derselben auf das Heparinplasma ebenfalls untersucht. Die Wirkung dieser Auszüge war mit der Wirkung der aus denselben Organen hergestellten lebenden Zellsuspensionen im allgemeinen nicht übereinstimmend (Tabelle 2).

Nach Anwendung des Leberextraktes blieb also das Plasma durchschnittlich 4 Min. lang in nicht geronnenem Zustande. Ohne Leberextrakt erfolgte die spontane Gerinnung des Heparin-Kaninchenplasmas am schnellsten in 15—20 Min., meistens aber nur in 24 Stunden. Auf Wirkung des Herzmuskel-, Nieren-, Skeletmuskelauszuges konnte die Gerinnung etwas später festgestellt werden als auf Wirkung des Leberauszuges. Durch die auf ähnliche Weise hergestellten Hirn-, Lymphdrüsen-, Knochenmarkextrakte wurde die Gerinnung des Heparinplasmas überhaupt nicht beschleunigt.

Tabelle 2. Gerinnungszeit des Heparinplasmas von Kaninchen unter Wirkung von verschiedenen Gewebsextrakten.

	Organextrakt ccm	Heparinplasma von Kaninchen ccm	Gerinnungszeit (Mittelwert)	Zahl der Versuche
1. Leberextrakt	0,1	0,1	4′ 0″	30
2. Herzmuskelextrakt	0,1	0,1	6 10	30
3. Gehirnextrakt	0,1	0,1	∞	30
4. Skeletmuskulaturextrakt ..	0,1	0,1	10 50	30
5. Nierenextrakt.....	0,1	0,1	7 0	30
6. Lymphknotenextrakt.....	0,1	0,1	∞	80
7. Knochenmarkextrakt.....	0,1	0,1	∞	30

IV. Die Wirkung des Leberextraktes auf das Oxalat-Plasma.

Nachdem wir das Präparat durch langdauernde Dialyse gewonnen haben und schließlich auch mittels Elektrodialyse reinigten und es somit für arm an Elektrolyten betrachten konnten, war es schon in vornherein nicht wahrscheinlich, daß wir durch Zugabe des Extraktes zum Plasma einfach die Ca-Ionenmenge zu steigern vermögen.

Trotzdem untersuchten wir, ob der Leberauszug den Mangel an Ca-Ionen zu ersetzen imstande ist?

Herstellung des Oxalatplasmas. Zu 30 ccm aus der Carotis entnommenem Kaninchenblut wurden 0,03 g Natriumoxalat zugefügt. Das auf diese Weise erhaltene 0,1%ige Oxalatplasma geronn nicht spontan. Es erfolgte auch in dem Falle keine Gerinnung, wenn zu je einem Röhrchen 0,1 ccm 0,5%iger Leberauszug gegeben wurde. Zwecks Veranschaulichung seien 2 Versuchsreihen dargestellt (Tabelle III und IV).

Durch den Leberauszug allein wird demnach das Oxalatplasma nicht gerinnungsfähig. (Von 14 Röhrchen erfolgte eine Gerinnung nur in 1 Röhrchen nach 7 Min.) Dieselbe Leberextraktmenge ließ das Heparinplasma regelmäßig in 5 Min. 30 Sek. bis 9 Min. 33 Sek., meistens in 6 Min. 30 Sek. gerinnen.

Das Oxalatplasma geronn auf Wirkung des Leberauszuges im allgemeinen auch dann nicht, wenn außerdem auch Knochenmarksuspension zugegeben wurde (s. Tabelle 4). Von 20 Röhrchen konnte nur 1 Gerinnung festgestellt werden in 13 Min. 30 Sek.

Dieselbe Leberextraktmenge hat die Gerinnungszeit des Heparinplasmas in Anwesenheit von Knochenmarksuspension beschleunigt. Anstatt in 9—10 Min. (wie wir es in den vorigen Versuchen sahen) erfolgte die Gerinnung in 3 Min. 30 Sek. bis 4 Min. 15 Sek. Das Oxalatplasma allein geronn während der Versuchsdauer nicht. Das Heparinplasma geronn von 12 Röhrchen in 6 in 15 Min. 30 Sek. bis 20 Min., in den übrigen 6 Röhrchen konnte während der Beobachtungszeit überhaupt keine Gerinnung festgestellt werden. Es erfolgte auch dann keine Gerinnung, wenn zum Oxalatplasma 2—4mal mehr Leberextrakt zugefügt wurde.

Tabelle 3. Die Wirkung von Leberextrakt auf das Oxalatplasma und auf das Heparinplasma.

	0,1 ccm Oxalatplasma (0,1 %) + 0,1 „ 0,9 %ige NaCl + 0,1 „ 0,5 %iger Leberextrakt							0,1 ccm Heparinplasma (0,02 %) + 0,1 „ 0,9 %ige NaCl + 0,1 „ 0,5 %iger Leberextrakt						
Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gerinnungszeit I. . .	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	6' 39''	9' 33''	6' 30''	6' 30''	6' 30''	6' 0''	6' 30''	5' 0''
„ II. .	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	6 0	6 46	5 0	6 30	5 30	5 30	6 30	5 30

Tabelle 4. Die Wirkung von Leberextrakt auf das Oxalatplasma und Heparinplasma in Anwesenheit von Zellsuspensionen.

	0,1 ccm Oxalatplasma (0,1 %) + 0,1 „ 0,5 %iger Leberextrakt + 0,1 „ 0,5 %ige Knochenmarksuspension					0,1 ccm Heparinplasma (0,02 %) + 0,1 „ Leberextrakt + 0,1 „ Knochenmarksuspension					Oxalatplasma (0,02 %) (Kontrolle)		Heparinplasma (0,02 %) (Kontrolle)		
Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gerinnungszeit I. . .	∞	∞	∞	∞	∞	3' 45''	3' 30''	3' 30''	3' 30''	3' 45''	∞	∞	15' 15''	14' 45''	14' 45''
„ II. .	∞	∞	∞	∞	∞	4 0	4 15	3 45	4 0	3 30	∞	∞	—	20 0	—
„ III.	∞	∞	∞	∞	13' 30''	3 45	3 45	4 15	3 30	4 30	∞	∞	—	15 0	15 0
„ IV .	∞	∞	∞	∞	∞	4 0	4 15	4 15	3 45	3 15	∞	—	—	—	—

Die Gerinnung des Oxalatplasmas wird demnach durch den Leberauszug allein nicht hervorgerufen. Die Gerinnung erfolgt aber, wenn zugleich die optimale Menge $CaCl_2$ (0,0025 mol.) zugegeben wird (s. Tabelle 5).

V. Kann die Wirkung der Thrombokinase durch den Leberauszug ersetzt werden?

Um auf diese Frage eine Antwort zu erhalten, wurde das Oxalatplasma recalcifiziert und sodann aus Gehirn oder Lunge hergestellte Thrombokinase bzw. Leberauszug hinzugefügt (Tabelle 6).

Herstellung der Thrombokinase. Das Hirn und die Lunge eines frisch geschlachteten Kaninchens wird von den Blutgefäßen und Blut möglichst gereinigt, mit Wasser abgewaschen und abgewogen. Sodann wurden die Organe in einer Reibschale mit Meersand zu Brei verrieben und aus diesem mittels 0,85 %iger NaCl-Lösung ein Extrakt bereitet. Der Extrakt wurde 15 Min. bei 60° C gehalten, um die aus den Organen, dem Blute zurückgebliebenen Thrombin- und Prothrombinspuren zu inaktivieren. Die Gewebesuspension wurde hernach

Tabelle 5. Versuche mit Oxalatplasma.

Nr.	1	2	3	4	5
0,5%iger Leberextrakt in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,1%iges Oxalatplasma in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,25%ige mol. $CaCl_2$ in ccm.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,85%ige NaCl in ccm.....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Gerinnungszeit I.....	1′ 30″	1′ 30″	1′ 30″	1′ 30″	1′ 30″
„ II.....	1 0	1 30	1 30	1 30	1 30

leicht zentrifugiert und die obere opaleszierende Flüssigkeit als Thrombokinasepräparat verwendet.

Das Thrombokinasepräparat brachte das Oxalatplasma ohne Zugabe von Ca nicht zur Gerinnung, in Anwesenheit von 0.025 mol. $CaCl_2$ aber tritt die Gerinnung auf Wirkung der Lungenthrombokinase in $^1/_2$ Min. und auf Wirkung der Hirn-Thrombokinase durchschnittlich in 1 Min. ein. Falls zu dem recalcifizierten Oxalatplasma anstatt Thrombokinase Leberextrakt zugegeben wurde, erfolgte die Gerinnung in 1—2 Min. Der Leberauszug kann also — wenn er auch schwächer wirkt — die Wirkung der Thrombokinase ersetzen, trotzdem, daß er keine Thrombokinase enthält, nachdem ja darin keine Lipoide und kein Cephalin vorhanden ist (Ätherextrahierung!).

VI. Versuche mit Fibrinogenlösung.

Zwecks weiterer Bestätigung voriger Beobachtung wurden Versuche auch mit gereinigter Fibrinogenlösung durchgeführt. Nach vorangehenden Versuchen wurde in dieser Versuchsreihe die dreifache Menge $CaCl_2$ (0.1 ccm = 0.075 Mol) verwendet und die Wirkung der Hirn- und Lungenthrombokinase, des Leberauszuges und des frischen Kaninchenserums auf die Fibrinogenlösung auf diese Weise verglichen.

Bereitung der Fibrinogenlösung. 5 ccm Oxalat-Kaninchenblut wurden mit 10 ccm 0.85%iger NaCl-Lösung verdünnt und mit 5 ccm gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung behandelt. Das ausgefällte Fibrinogen wurde durch Zentrifugieren separiert, in 15 ccm phys. NaCl-Lösung wieder aufgelöst, abermals mit Ammoniumsulfat ausgefällt, und dieses Verfahren sodann noch zweimal wiederholt. Das fertige Fibrinogen wurde schließlich in 5 ccm phys. NaCl-Lösung aufgelöst.

Nach den in der Tabelle 7 dargestellten Ergebnissen gerinnt die Fibrinogenlösung in Anwesenheit von Thrombokinase und $CaCl_2$ nicht, sondern nur dann, wenn auch frisches Kaninchenserum (Prothrombin) hinzugefügt wird. Die Gerinnungszeit konnte mit der Steigerung der Ca Ionenmenge verkürzt werden. Der Leberauszug bringt, ähnlich den Thrombokinasepräparaten, die Fibrinogenlösung nur in Anwesenheit genügender Ca-Ionen und frischen Kaninchenserums zur Gerinnung. Bei Anwendung der Hirn- und Lungenthrombo-

Tabelle 6. Versuche mit Oxalatplasma und Thrombokinase.

Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0,1%iges Oxalatplasma in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Thrombokinase (Gehirn) in ccm	0,1	0,1	0,2	0,2	-		–	—	0,1	0,2	—	—		—	-
Thrombokinase (Lunge) in ccm	—	—			0,1	0,1	0,2	0,2		—	—			—	—
0,025%ige mol. $CaCl_2$ in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	0,1	—	—
0,5%iger Leberextrakt in ccm	—	—	—	—	-	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
0,85%ige NaCl in ccm	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	—	—	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Gerinnungszeit I	1′ 0″	1′ 0″	0′ 30″	1′ 0″	0′ 30″	0′ 30″	0′ 30″	0′ 30″	∞	∞	2′ 0″	2′ 0″	1′ 30″	∞	∞
„ II	1 0	1 0	1 0	1 0	0 30	0 30	0 30	0 30	∞	∞	1 30	1 0	1 30	∞	∞
„ III	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	0 30	0 30	0 30	∞	∞	1 30	1 30	1 30	∞	∞

Tabelle 7. Versuche mit Fibrinogenlösung.

Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Fibrinogenlösung in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Thrombokinase (Gehirn) in ccm	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Thrombokinase (Lunge) in ccm	—	—	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—
0,075%ige mol. $CaCl_2$ in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	—	0,1
0,5%iger Leberextrakt in ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
Frisches Kaninchenserum in ccm	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,15%ige NaCl in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—	—
Gerinnungszeit	∞	∞	∞	∞	∞	12′ 0″	9′ 0″	9′ 30″	∞	∞	15′ 0″	15′ 0″	∞	∞	10′ 0″

kinase gerinnt aber das aus Fibrinogen + Ca-Ionen + frisches Kaninchenserum bestehende System bedeutend rascher (9—12 Min.) als dann, wenn anstatt derselben Leberextrakt verwendet wird (15 Min.).

VII. Ist der Leberextrakt imstande, eine Prothrombinwirkung auszuüben?

Nachdem das Prothrombin aus dem Oxalatplasma ohne Nachteil des Fibrinogengehalts nach einer mittels Aluminium-Hydroxydbrei durchgeführten Adsorption entfernt werden kann, konnten wir auch auf diese Frage eine Antwort erhalten.

Herstellung des prothrombinfreien Plasmas. Nach den auf Grund des von A. Quick verwendeten Verfahrens ausgeführten Vorversuchen fanden wir es für notwendig, den Aluminium-Hydroxydbrei auf folgende Weise frisch herzustellen: 8.6 g $Al_2(SO_4)_3$ + 18 g H_2O und 2,9 g Na (OH) wurden in 30 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wurde stehengelassen, bis der entstandene Niederschlag sich setzte. Der Niederschlag wurde 24 Stunden lang dialysiert, bis im äußeren Raum im H_2O mittels $BaCl_2$ keine Sulfatspuren mehr nachweisbar waren. Sodann wurde der Aluminium-Hydroxydbrei in einem Zentrifugenröhrchen 10 Min. leicht (Drehzahl 1000 pro Min.) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ccm 0.9%iger NaCl-Lösung suspendiert, von der Suspension zu je 1 ccm Oxalatplasma 0.1 ccm zugefügt und nach 15 Min. Stehenlassen bei 37° energisch abzentrifugiert, bis vollkommen reines Plasma („Alumenplasma") entstand.

Aus der Tabelle 8 ist ersichtlich, daß:

1. das prothrombinfreie Plasma („Alumenplasma") nach Zugabe von $CaCl_2$ nicht gerinnt,

2. eine Gerinnung auch dann nicht stattfindet, wenn neben dem $CaCl_2$ Leberauszug oder Thrombokinasepräparat (aus Hirn oder Lunge) hinzugefügt wird,

3. die Gerinnung aber stattfindet, wenn außer den in 2. aufgezählten Faktoren noch frisches Serum (Prothrombin) zugefügt wird. Die Gerinnung tritt aber nach Zugabe der Thrombokinase bzw. des Leberauszuges in verschiedener Zeit ein. Am schnellsten erfolgt sie nach Zugabe der aus der Lunge hergestellten Thrombokinase, langsamer in Anwesenheit der Hirn-Thrombokinase und noch langsamer bei Anwendung des Leberextraktes.

Der Leberauszug konnte demnach auch in dieser Versuchsreihe, wenn auch schwach, die Thrombokinasepräparate ersetzen, war aber nicht imstande, eine Prothrombinwirkung auszuüben, nur in Anwesenheit von frischem Serum.

Tabelle 8. Versuche mit prothrombinfreiem Plasma.

Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
„Alumen"-Plasma in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,025 mol. $CaCl_2$ in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,25%iger Leberextrakt in ccm .	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Thrombokinase (Gehirn) in ccm	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—
Thrombokinase (Lunge) in ccm.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	—
Frisches Kaninchenserum in ccm	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	—	—	—
0,85%ige NaCl in ccm.....	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Gerinnungszeit I.....	∞	∞	∞	∞	4' 30"	4' 30"	1' 30"	1' 30"	∞	∞	1' 0"	1' 0"	∞	∞	∞
„ II.....	∞	∞	∞	∞	4 0	5 0	3 0	3 0	∞	∞	2 0	1 0	∞	∞	∞
„ III.....	∞	∞	∞	∞	5 0	5 0	2 30	2 0	∞	∞	1 30	1 30	∞	∞	∞
„ IV	∞	∞	∞	∞	5 0	5 0	1 0	1 0	∞	∞	1 0	2 30	∞	∞	∞

Tabelle 9. Versuche mit prothrombinfreiem Plasma in Anwesenheit von Heparin.

Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
„Alumen"-Plasma in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,025 mol. $CaCl_2$ in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,5%iger Leberextrakt in ccm..	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—		—	—	0,1	0,1	0,1
Thrombokinase (Gehirn) in ccm	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	—				—	—	—
Thrombokinase (Lunge) in ccm.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Frisches Kaninchenserum in ccm	—	—	0,1	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Heparin 0,1% in ccm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,85%ige NaCl in ccm	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	—		—	—	—
Gerinnungszeit I.....	—	—	6' 30"	7' 0"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1' 30"	2' 0"	1' 30"
Gerinnungszeit II.....	—	—	5 30	5 0	—	—	—	—	—	—			—	1' 30"	2 0	2 0

VIII. Versuche mit prothrombinfreiem Plasma in Anwesenheit von Heparin.

Falls die vorigen Versuche auf die Weise wiederholt wurden, daß zu den einzelnen Röhrchen vorher Heparin (0,02%) gegeben wurde, konnte folgendes festgestellt werden (s. Tabelle 9).

1. In dem mit frischem Serum (Prothrombin) komplettierten System erfolgt eine Gerinnung in Anwesenheit von Heparin weder auf Wirkung des aus dem Hirn gewonnenen, noch auf die des aus der Lunge hergestellten Thrombokinasepräparates. In den vorigen Versuchen konnten dieselben Thrombokinasedosen ohne Heparin in Anwesenheit der übrigen Faktoren eine vollständige Gerinnung hervorrufen.

2. Die Gerinnung erfolgt aber, wenn Leberextrakt zugefügt wird, indem dadurch die Wirkung des Heparins aufgehoben wird. Der Leberextrakt übt (in derselben Menge) diese heparinhemmende Wirkung auch ohne Thrombokinase aus (Röhrchen 3 und 4). Auffallend ist aber, daß die Gerinnung rasch und wirklich vollständig nur dann vor sich geht, wenn außer dem Leberauszug, dem $CaCl_2$, frischem Serum auch Lungenthrombokinase vorhanden ist (Röhrchen 14, 15 und 16). In den Röhrchen 3 und 4 blieb nämlich neben sichtbarer Ausscheidung einiger Fibrinbündel das Plasma halb flüssig, und auch dieser Prozeß war langsam: der Inhalt der letzteren Röhrchen dagegen konnte nicht ausgeschüttet werden, das Plasma geronn in ihnen im Ganzen.

Die Antiheparinwirkung des Leberextraktes ist demnach in Anwesenheit der Lungen-Thrombokinase vollkommener als ohne derselben.

C. Besprechung der Folgerungen.

Die Erklärung der mitgeteilten Blutgerinnungsversuche wird auch durch den Umstand erschwert, daß wir bezüglich des Gerinnungsprozesses auch gegenwärtig über keine einheitlich angenommene Auffassung verfügen. Der größte Teil der europäischen Autoren hält sich an die Auffassung von Alexander Schmidt, Morawitz (23), Bordet (1) und Wöhlisch (36), nach welcher die Thrombokinase (thromboplastischer Stoff, Thromboplastin) im Falle ausreichend vorhandenen Ca auf das Prothrombin auf direktem Wege aktivierend wirkt. Howell (16—19) und nach ihm die amerikanische Schule lehrt, daß die Thrombokinase, oder wie sie es nennen, das Thromboplastin nicht direkt wirkt, sondern nur das Antiprothrombin neutralisiert, welches gewöhnlich an das Prothrombin gebunden im Blute vorhanden ist und dadurch die Umgestaltung des Prothrombins in Thrombin verhindert. Wenn das Antiprothrombin entfernt bzw. außer Wirkung gesetzt wird, so reagiert das Prothrombin mit dem Calcium und bildet Thrombin. Bezüglich der weiteren (Fibrinogen — Thrombin — Fibrin) sind schon die beiden Theorien übereinstimmend.

Die Antiprothrombin- (oder Antithrombin-) Wirkung wird im Organismus in Anwesenheit neutraler Salze durch das Heparin (Howell) ausgeübt, welches in der Leber und vielleicht auch anderswo im Gefäßendothelium entsteht. Nach Howells Theorie wird angenommen, daß der essentielle Bestandteil des thromboplastischen Stoffes (der Thrombokinase) das Cephalin ist, welches aus Blutelementen oder angegriffenen Gewebselementen stammt, das Heparin neutralisiert, durch welches letzteres das Blut in vivo flüssig gehalten wird. So können bei Heparinmangel die Calciumsalze das Prothrombin in Thrombin umgestalten. Das freie Cephalin ist für sich allein nicht identisch mit der Thrombokinase (Thromboplastin), sondern ist wahrscheinlich an ein Eiweiß gebunden in der Thrombokinase vorhanden (Howell). Die Koagulationstemperatur dieses Eiweißes ist verhältnismäßig niedrig.

Andere Theorien über die Blutgerinnung [Nolf (24), Mills, Pickering] ließen wir unbeachtet und faßten nur die beiden am meisten bekannten Theorien zusammen, um unsere eigenen Beobachtungen mit denselben in Zusammenhang zu bringen.

Zwischen dem Blutgerinnungsprozeß und der Tätigkeit der Leber wurde bisher ein derart vielfacher Zusammenhang festgestellt, daß dies gegenwärtig fast störend wirkt.

So kann in erster Reihe das Fibrinogen, der Präcursor des Fibrins als aus der Leber herstammend betrachtet werden [M. Doyon (10) (1905), J. A. Whipple und S. H. Hurwitz (33) (1911), D. D. Foster und G. H. Whipple (12) (1922), Nolf (1905), McMaster und Drury (22) (1928). Jones und Smith (20) (1930)].

Das Adrenalin besitzt in vitro keine Wirkung auf die Blutgerinnung. Falls der Adrenalingehalt im kreisenden Blute gesteigert wird, dann nimmt auch die Gerinnungsfähigkeit des Blutes zu, nach den Versuchen mit Teilnahme der Leber (ihre gesteigerte Fibrinogenerzeugung und das Gelangen desselben in das Blut?). Wenn nämlich die Leber aus dem Kreislauf ausgeschaltet wird, bleibt diese Wirkung der Adrenalininjektion aus [Gray und Lunt; Cannon und Mendenhall (1914)].

Obwohl das Antithrombinwirkung besitzende Heparin auch aus der Lunge, dem Muskel hergestellt werden kann und in verschiedenen anderen Geweben nachweisbar ist [Charles und Scott (4)], wurde es ursprünglich aus Hundeleber isoliert, weshalb es auch diesen Namen von dem Hersteller. Howell, bekam.

Es ist bekannt, daß durch intravenöse Einspritzung großer Peptongaben z. B. bei Hunden die Blutgerinnung bei Schocksymptomen und Blutdruckabnahme aufgehoben wird. Das Blut der auf diese Weise behandelten Tiere hemmt auch die Gerinnung des Blutes anderer Tiere. Die Bildungsstelle des darin vorhandenen Stoffes „Anticoagulin" dürfte nach Delezenne ebenfalls die Leber sein. Obwohl es nicht endgültig geklärt ist,

scheint es doch wahrscheinlich zu sein, daß auch dieser Stoff antithrombinartig wirkt.

Neuere Versuchsergebnisse zeigen, daß auch die Bildungsstelle des Prothrombins in der Leber wäre. Howell nahm als Maß des vorhandenen Prothrombins die Gerinnungsdauer des recalcifizierten Plasmas. Quick, Stanley-Brown und Bancroft (25) (1935) modifizierten dieses Verfahren und verwendeten es zu quantitativer Messung des Prothrombingehalts des Blutes. Warner, Brinckhous und Smith (30, 31) (1936) untersuchten den Prothrombingehalt des Blutplasmas bei verschiedenen Versuchsbedingungen. Hypothrombinämie fanden sie bei akuter Chloroformvergiftung. In solchem Falle ist auch der Fibrinogengehalt des Blutplasmas verringert, was aber später beginnt und früher endet. Die Prothrombin- und Fibrinogenwerte zeigten dieselben Veränderungen auch nach Phosphorvergiftung.

Der Prothrombingehalt des Plasmas bleibt normal, wenn das Tier intravenös mit Pepton behandelt wird und dadurch die Blutgerinnungsfähigkeit aufgehoben wird. Ebenso wird der Prothrombingehalt des Blutes nicht verändert, wenn die Blutgerinnungsfähigkeit in vitro durch Heparin aufgehoben wird.

Die Blutungsbereitschaft bei Hunden mit Gallenfistel konnte ebenfalls mit dem Prothrombinmangel des Blutes in Zusammenhang gebracht werden [Hawkins und Brinckhous (15) (1936)]. Bei im Laufe obstruktiver Gelbsucht sich entwickelter und anderer Blutungsbereitschaft konnte sowohl bei Menschen als bei Tieren ein verringerter Prothrombingehalt des Blutplasmas festgestellt werden [Quick, Stanley-Brown, Bancroft; Roderich; H. Dam; F. Schønheyder und Tage-Hansen. Schrifttum siehe in der Arbeit: Smith, Warner und Brinckhous (29)].

Zu ähnlichen Ergebnissen kam Warner (32) (1938) dadurch, daß er bei Ratten einen bedeutenden Teil der Leber (60 - 70%) entfernte. Der Prothrombingehalt des Plasmas nahm nach der Operation bedeutend (20 bis 40%) ab und kam nur langsam, stufenweise zur Norm zurück, etwa in dem Zeitpunkt (3 Wochen), als auch die Gewebssubstanz der Leber ersetzt wurde. Der Fibrinogengehalt des Blutes nahm nach der Operation verhältnismäßig weniger ab als der Prothrombingehalt.

Bei Anwendung derselben Methode untersuchten J. Sloan, Wilson (34) (1939) den Prothrombingehalt des Blutes bei gesunden und leberkranken Personen, bei denen keine Gallenwegverschließung vorhanden war. Sie fanden, daß dieser Wert mit äußerst großer Empfindlichkeit dem Grade der bestehenden Leberschädigung folgt. Große Gaben K-Vitamin und gallensäurige Salze konnten auf den Prothrombingehalt des Blutes keinen nachweisbaren Einfluß ausüben. Auch ihre Befunde zeigten kein ständiges Verhältnis zwischen dem Plasma-Fibrinogen und dem Plasma-Prothrombin. Die beiden Werte verhielten sich manchmal auch entgegengesetzt.

Ebenfalls auf Krankenmaterial beruhend zeigen die neuesten Versuche von Koller und Wuhrmann (21) (1939), daß für die beim Stauungsicterus beobachtbaren Blutungsstörungen der Prothrombinmangel des Blutplasmas verantwortlich sein kann. Verfasser konnten diesen Mangel durch fettlösliches K-Vitamin-Präparat ausgleichen. Über dieselben Erfolge berichten schon 1938 Dam und Glavind (8); Warner, Brinckhous und Smith (30); sowie Butt, Snell und Osterberg (2).

Das K-Vitamin wurde durch Dam (5, 6, 7) (1935) ebenfalls aus Schweineleberfett hergestellt. Eigentümlich ist, daß auch er in der aus der Leber isolierten „nicht verseifbaren", „Nicht-Sterin"-Fraktion jenen Stoff auffinden konnte, dessen Fehlen subcutane Muskel- und Bauchhöhlenblutungen zur Folge hat, besonders beim Geflügel. Das von uns hergestellte Präparat ist aber auch wasserlöslich, das K-Vitamin ist dagegen ein in Fett löslicher öliger Stoff. Nach Dam (7) dürfte er die prostetische Gruppe des Prothrombins bilden. Deshalb nimmt im Falle eines K-Vitamin-Mangels die Prothrombinmenge des Blutes ab.

Aus allen diesen Mitteilungen geht hervor, als nehme die Leber an der Produktion des Plasma-Prothrombins auf irgendeine Weise teil. Nach unseren Versuchen aber ist unser Leberauszug nicht imstande, die Wirkung des Prothrombins zu ersetzen. Dagegen konnte derselbe — wenn auch schwächer wirkend — die Rolle der Thrombokinase übernehmen. Auf Grund dessen kann aber nicht angenommen werden, daß er einfach Thrombokinase enthält. Der Auszug wurde nämlich mehrmals mit Äther extrahiert, kann demnach auch keine Lipoide und somit kein Cephalin, die wesentlichen Bestandteile der Thrombokinase, enthalten. Unser Extrakt enthält nur Stoffe, die Biuretreaktion geben, aber keine Eiweiße. In der Thrombokinase stellen wir uns das Cephalin an Eiweiße gebunden vor. Nachdem der Extrakt auch keine Globuline enthält, kann auch kein „Gewebe-Fibrinogen" [beschrieben durch Wooldridge (35) (1884)] vorhanden sein, welches aus bei 56° C koagulierendem Globulin und Phospholipoid besteht. (Dieser Name ist irreführend, da er einen thromboplastischen Stoff bezeichnen will.) Die intravenöse Einspritzung letzteren Stoffes ruft in kurzer Zeit intravasculare Gerinnung hervor. Der besprochene Leberauszug besaß diese Wirkung nicht.

Bei unserem Versuch war auffallend, daß der Leberauszug besonders die Gerinnung des Heparinplasmas beschleunigte und diese seine Wirkung in den mit prothrombinfreiem Plasma durchgeführten Versuchen nicht auffällig war. Nachdem die Wirkung des Leberauszuges nicht mit dem Cephalin identifiziert werden kann, müssen wir uns damit begnügen, daß wir dem in ihm enthaltenen, gerinnungsbeschleunigenden Stoff den Namen „Antiheparinfaktor" geben. Der Wirkungsmechanismus des Heparins ist seinem Wesen nach nicht bekannt, und auch das kann noch nicht als geklärt betrachtet werden, daß die Flüssigkeit des normalen Blutes durch Heparin gesichert wird. Einige Autoren meinen, daß es die Menge der Ca-Ionen zu

reduzieren imstande wäre. Falls sich diese Annahme als wahr erweist, so ist es erdenkbar, daß der Antiheparinfaktor durch die indirekte Steigerung der Ca-Ionenzahl wirkt. Vielleicht liegt hier der Grund dafür, daß seine Wirkung besonders dann zur Geltung kommt, wenn auch eine lebende Zellsuspension anwesend ist. Unsere mit aus Lymphdrüsen hergestellter Zellsuspension durchgeführten Versuche zeigen nämlich, daß der Einfluß der Zellen durch Wärmewirkung (3 Min. bei 100°) ausgeschaltet werden kann.

D. Zusammenfassung.

1. Blutgerinnungsversuche mit Kaninchenplasma auf Grund der Methode von Albert Fischer. Der Leberauszug wurde aus Schweineleber, aus dem durch mehrmalige Ätherextrahierung des nicht verseifbaren Teiles gewonnenem „Nicht-Sterin"-Teil hergestellt. Das so gewonnene braune Pulver ist stark hygroskopisch, löst sich in Wasser in Menge von 1% und in 0,9%iger NaCl-Lösung in Menge von 0,5%; enthält Stoffe, welche Biuretreaktion geben und ergibt positive Mollisch-Udránszky-Reaktion.

2. Der Leberauszug beschleunigte die Gerinnung des Heparinplasmas am besten in Anwesenheit der Lymphdrüsen- und Herzmuskelsubstanz. Die Milz allein läßt das Heparinplasma zu rasch gerinnen, wodurch der Einfluß des Leberextraktes schwer festgestellt werden kann. Am besten konnte die auf die Hälfte verringerte Gerinnungszeit des mit Knochenmark behandelten Plasmas beobachtet werden, nachdem die Gerinnung des Heparinplasmas am spätesten in Anwesenheit der Knochenmarksuspension erfolgte.

3. Durch Steigerung der Leberextraktkonzentration (von 0,1 auf 0,5%) konnte die Gerinnung des Heparinplasmas beschleunigt werden. Über einer Konzentration von 0,5% nahm aber die Wirkung nicht zu.

4. Die gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Leberauszuges auf das Heparinplasma war am auffallendsten in Anwesenheit lebender aktiver Zellsuspensionen. Die Wirkung des Leberextraktes kommt nicht zur Geltung, wenn die Zellsuspension vorher einer Wärmewirkung (3 Min. bei 100°) ausgesetzt wird.

5. Die Verdünnung des Heparinplasmas auf das Dreifache kann die gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Leberauszuges in Anwesenheit von Knochenmarksuspension wesentlich vermindern. Das Zurgeltungkommen der Leberextraktwirkung benötigt eine gewisse minimale Menge sowohl der in dem Plasma als der in der Zellsuspension enthaltenen Blutgerinnungsfaktoren. Diese Faktoren sind thermolabil gegenüber dem Leberfaktor, welcher thermostabil ist.

6. Durch intravenöse Verabreichung des Leberextraktes wird intravasculäre Gerinnung, Embolie, nicht hervorgerufen.

7. Aus anderen Organen auf ähnliche Weise hergestellte Auszüge beschleunigen die Gerinnung des Heparinplasmas nicht in dem Grade wie der Leberauszug. Zu demselben stand am nächsten die Wirkung der aus dem Herzmuskel, den Nieren und Skeletmuskel hergestellten Extrakte. Durch Knochenmark-, Gehirn- und Lymphdrüsenextrakte wird die Plasmagerinnung überhaupt nicht beschleunigt.

8. Das Oxalatplasma wird durch den Leberauszug allein, ohne Zugabe von Calcium auch in Anwesenheit von Zellsuspension (Knochenmark) nicht zur Gerinnung gebracht. Die blutgerinnungsbeschleunigende Wirkung des Extraktes steht demnach nicht im Zusammenhang mit seinem Calciumgehalt.

9. Der Leberauszug bringt das recalcifizierte Oxalatplasma zur Gerinnung, wirkt aber schwächer als das aus Gehirn und noch schwächer als das aus Lunge hergestellte Thrombokinasepräparat. Dasselbe geht auch aus den mit Fibrinogenlösung durchgeführten Versuchen hervor. Der Leberauszug kann demnach — wenn auch schwächer — die Thrombokinasewirkung ersetzen. Derselbe kann trotzdem nicht z. B. der Lunge und Thrombokinase ähnlich sein, weil der Extrakt infolge der Herstellungsmethode weder Eiweiße, noch Phospholipoide (Cephalin) enthalten kann. Aus demselben Grunde und weil der Extrakt keine intravasculare Gerinnung hervorruft, kann auch von der Anwesenheit des „Gewebefibrinogens" nach Wooldridge keine Rede sein.

10. Der Leberauszug ist nicht imstande, die Wirkung des entfernten Prothrombins zu ersetzen, obwohl zahlreiche neuere Literaturangaben dafür sprechen, daß die Leber am mindesten eine wichtige „Übergangs"-Stelle der Prothrombinbildung ist.

11. Das durch Dam hergestellte K-Vitamin kann hier nicht als Wirkungsstoff betrachtet werden, weil derselbe ein ölartiger Stoff ist. Seine Wirkung wäre ebenfalls mit der Prothrombinbildung in Zusammenhang.

12. Die gerinnungsbeschleunigende Wirkung konnte hauptsächlich im Heparinplasma beobachtet werden. Nachdem die Rolle des Cephalins nicht angenommen werden kann, erschien es am zweckmäßigsten, dem Wirkungsstoff den Namen „Antiheparinfaktor" zu geben. Der indirekte Charakter seiner Rolle zeigt sich darin, daß seine Wirkung am besten in Anwesenheit von lebender aktiver Zellsuspension bzw. aus Lunge hergestellter Thrombokinase zur Geltung kommt.

Literatur.

1) Bordet, J.: Am. l'Inst. Pasteur **34**, 561 (1920). — 2) Butt, Snell u. Osterberg: Proc. Staff Meet. Mayo Clin. **13**, 74 (1938). — 3) Cannon u. Mendenhall: Amer. Physiol. **34**, 243 (1914). — 4) Charles u. Scott: J. biol. Chem. (Am.) **102**, 431, 437 (1933). — 5) Dam, H.: Nature **135**, 652 (1935). — 6) Dam, H.: Biochem. J. (Brit.) **29**, 1273 (1935). — 7) Dam, H.: XVI. Internation. Physiologen-

kongreß. Kongreßbericht II. S. 57. Zürich 1928. — 8) Dam u. Glavind: Lancet, March 26 th, S. 720 (1938). — 9) Dam, H. u. Lewi: Biochem. J. (Brit.) **31**, 17 (1937). — 10) Doyon, M.: C. r. Soc. biol. **58**, 30 (1905). — 11) Fischer, A.: Pflügers Arch. **225**, 737 (1930). — 12) Foster, D. P., u. G. H. Whipple: Amer. J. Physiol. **58**, 407 (1922). — 13) Gratia, A., u. P. A. Levene: J. biol. Chem. (Am.) **50**, 455 (1922). — 14) Gray u. Lunt: Amer. J. Physiol. **34**, 232 (1914). — 15) Hawkins, W. B., u. K. M. Brinkhous: J. exper. Med. (Am.) **63**, 795 (1936). — 16) Howell, W. H.: Harvey Lectures **12**, 272 (1916/17). — 17) Howell, W. H.: Bull. Hopkins Hosp., Baltim., **42**, 199 (1928). — 18) Howell, W. H.: Physiol. Rev. (Am.) **15**, 435 (1935). — 19) Howell, W. H.: Amer. J. Physiol. **31**, 1 (1912/13). — 20) Jones u. Smith: Ebenda **94**, 144 (1930). — 21) Koller u. Wuhrmann: Klin. Wschr., Nr. 31, S. 1058 (1930). — 22) Mc Master u. Drury: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **26**, 490 (1928). — 23) Morawitz, P.: Erg. Physiol. usw. **4**, 368 (1905). — 24) Nolf: Arch. internat. physiol. **3**, 1 (1905). — 25) Quick, Stanley-Brown u. Bancroft: Amer. J. Med. Sci. **190**, 501 (1935). — 26) Quick, Armand, J.: Amer. J. Physiol. **114**, 282 (1936). — 27) Quick, Armand, J.: Ebenda **123**, 712—719 (1938). — 28) Schönheyder: Nature **135**, 652 (1935). — 29) Smith, H. P., E. D. Warner u. K. M. Brinkhous: J. exper. Med. (Am.) **66**, 801 (1937). — 30) Warner, E. F., K. M. Brinkhous u. H. P. Smith: Amer. J. Physiol. **114**, 667 (1936). — 31) Warner, E. D., K. M. Brinkhous u. H. P. Smith: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **37**, 628 (1938). — 32) Warner, E. D.: J. exper. Med. (Am.) **68**, 831 (1938). — 33) Whipple, G. H., u. S. H. Hurwitz: Ebenda **13**, 136 (1911). — 34) Wilson, Sloan J.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **41**, 551 (1939). — 35) Wooldridge, L. C.: On the chemistry of the blood etc. Kegan Paul, Trench, Trubner & Co., London 1893. — 36) Wöllisch, E.: Erg. Physiol. usw. **28**, 443 (1929).

Mitteilung aus dem Pharmakologischen Institut der ungar. königl. Tisza István-Universität Debrecen. (Direktor: Dr. A. v. Jeney, o. ö. Univ.-Professor.)

Die Wirkung des Quercitrins auf den Ruhewert der Blutmilchsäure bei Hunden.

Quercitrin-1:2:4α-Dinitrophenol-Antagonismus.

Von

A. v. Jeney, T. Vályi-Nagy, L. Váczi und St. Mihalik.

(Eingegangen am 11. Februar 1940.)

A. v. Jeney und A. G. Czimmer[1] fanden, sich mit der Pharmakologie der Flavonglykoside befassend, daß das Quercitrin (Qu) und dessen Aglycon das Quercetin das Verschwinden der Milchsäure im arbeitenden Herzmuskel bzw. die Aufhebung der Milchsäurevergiftung fördert. Zugleich konnte T. Vályi-Nagy durch Methylenblau-Reduktionsversuche nachweisen, daß das Quercitrin die Rolle eines Hydrogenüberträgers übernehmen kann, indem die Entfärbungsdauer von Methylenblau auf Zugabe von Quercitrin verlängert wird. Demnach konnte angenommen werden, daß das Quercitrin in den Oxydationssystemen des lebenden Organismus auf irgendeine Weise teilnimmt. Somit wurde es von uns für nötig erachtet, die Wirkung des Quercitrins auf die Wärmeproduktion und Oxygenverbrauch der Tiere zu untersuchen.

Nach den Versuchen von A. v. Jeney, L. Ari und P. Baranyai[2] wird die Wärmeproduktion normaler Versuchstiere (Ratten) durch Quercitrin (12 mg/kg) um 6—14,5% herabgesetzt und die mittels 1 : 2 : 4 α-Dinitrophenol (DNP) (12 mg/kg) hervorgerufene Hyperthermie gehemmt. Auf Wirkung des Quercitrins wird die Wärmeproduktion um 20—30% geringer als bei Anwendung von reinem Dinitrophenol.

A. v. Jeney und T. Vályi-Nagy[3] konnten in respiratorischen Stoffwechselversuchen — welche mit Hilfe des nach Isseckutz modifizierten Warburgschen Respirationsapparates durchgeführt wurden - beobachten, daß der Atmungsstoffwechsel normaler Versuchstiere (Ratten) durch 12 mg/kg Qu durchschnittlich um 7,6% herabgesetzt wird und auch die durch DNP hervorgerufene Hyperthermie um etwa 50% geringer wird. Nachdem das Quercitrin den Oxygenverbrauch im Organismus eher verringert, stellt sich die Frage, auf welchem Mechanismus beruhend es die Wirkung der Milchsäurevergiftung im Organismus vermindert? Um diese

[1] Jeney, A. v., u. A. G. Czimmer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **183**, H. 4/5, S. 571—586 (1936). — [2] Jeney, A. v., Ari, L., u. P. Baranyai: Ebenda **191**, H. 3/4, S. 407—422 (1939). — [3] Jeney, A. v., u. T. Vályi Nagy: Ebenda **191**, H. 3/4, S. 423—429 (1939).

Frage beantworten zu können, untersuchten wir in vorliegender Arbeit, auf welche Art und Weise der Blutmilchsäurewert durch das Qu beeinflußt wird?

Methodik.

Zunächst wurden Milchsäure-Ruhewerte bei ein und demselben Tiere bestimmt und sodann die Veränderungen der normalen, sowie der durch 1 : 2 : 4 α-Dinitrophenol (DNP) beeinflußten Milchsäurewerte bei gleichzeitiger Wirkung des Quercitringlykosids beobachtet. Die bei ein und demselben Tiere durchgeführten Versuche fanden in Zeitabständen von 1 Woche statt.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir 6 Hunde von 6—14 kg Körpergewicht. Um die Werte in annähernd ruhendem Zustande zu erhalten, wurden die Tiere erst nach Angewöhnung und überhaupt schonender Behandlungsweise verwendet. In der Zeitfolge der Entnahme der Blutproben und in der ganzen Versuchstechnik war das Verfahren stets das gleiche. Die Milchsäurewerte wurden mittels der nach Friedemann, Cottonio und Schaffer[4] modifizierten Fürth-Carnassschen Methode bestimmt. Der Milchsäuregehalt des mittels Trichloressigsäure vom Eiweiß und mittels $Cu(OH)_2$ vom Kohlehydrat befreiten Blutfiltrats wurde in Anwesenheit von $MnSO_4$-Katalysator in phosphorsaurem Medium mittels $KMnO_4$ bei geringer Erwärmung in Acetaldehyd umgestaltet. Das entstandene Acetaldehyd wurde in das im Überfluß zugegebene $NaHSO_3$ getrieben und gebunden. Der $NaHSO_3$-Überfluß wurde mit n/5 J_2-Lösung neutralisiert, das gebundene Acetaldehyd mittels $NaHCO_3$ befreit und die mit dem Acetaldehyd äquivalente $NaHSO_3$-Menge mit n 100 Jodlösung in Anwesenheit von Stärke titriert (1 ccm n 100 J_2-Lösung entspricht 0,45 mg Milchsäure).

Die von uns ermittelten Milchsäure-Ruhewerte sind um 10—15% höher als die von Mattakas[5] und anderen gefundenen Milchsäurewerte; die gebannten Autoren benutzten aber das viel unbestimmtere Werte bietende volorimetrische Verfahren. Unsere Ergebnisse müssen wir um so mehr für bewertbar betrachten, als unser Hauptziel in erster Reihe das Erhalten von vergleichbaren Werten war.

Versuchsergebnisse.

Die Milchsäure-Ruhewerte wurden einesteils bei nicht narkotisierten, andernteils bei narkotisierten Hunden festgestellt. Natürlich fanden wir bei den narkotisierten Tieren viel niedrigere Milchsäurewerte, was besonders mit dem totalen Ruhezustand der Tiere erklärt werden kann. Wie aber von Mattakas und Mitarbeitern nachgewiesen wurde, kann der Milchsäure-

[4] Friedemann, Cottonio u. Schaffer: J. biol. Chem. (Am.) **100**, 291—308 (1933). — [5] Mattakas: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **163**, 463 (1931).

stoffwechsel des Organismus auch durch die Art des Narkoticums stark beeinflußt werden. Eben aus ihren Untersuchungen wissen wir, daß das Pernocton dasjenige Narkosemittel ist, welches die Milchsäurewerte am wenigsten beeinflußt. Nachdem wir uns auch von der Richtigkeit der Feststellungen obiger Autoren überzeugt haben, verwendeten auch wir bei unseren Versuchen Pernocton (0,04 g/kg). Der Milchsäuregehalt des Blutes der auf diese Weise narkotisierten Hunde war 60 Min. nach dem Beginn der Narkose im Mittelwert 39,9 mg pro 100 ccm. Nachdem der Milchsäurewert der 6 Tiere vor der Narkose im Durchschnitt 54,5 mg pro 100 ccm war, bedeutet dies, daß die Blutmilchsäureabnahme auch auf Wirkung des Pernoctons 26 % ergab (siehe Tabelle 2).

A. Die Wirkung des Quercitrins auf die Milchsäurewerte von nicht narkotisierten und narkotisierten Hunden.

Danach wurden die auf i. v. Verabreichung von 10 mg/kg Quercitrin auftretenden Verschiebungen der Milchsäurewerte beobachtet. Die Bestimmungen wurden zuerst bei nicht narkotisierten Hunden mit 30, 60 und 90 Min. nach der Qu-Injektion entnommenen Blutproben ausgeführt. Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, konnte ohne Ausnahme bei jedem Versuchstiere eine schwache Abnahme der Milchsäurewerte beobachtet werden (durchschnittlich 62,4 mg pro 100 ccm). Diese Verminderung ergab 10,1 %. Dasselbe wurde bei den narkotisierten Hunden wiederholt und wie aus Tabelle 3 ersichtlich, wurden die Bestimmungen hier 5, 10, 15, 25, 35, 45 und 60 Min. nach dem Eintritt der Narkose und der Injizierung des Quercitrins (10 mg/kg) durchgeführt. Die Befunde zeigten, daß die Blutmilchsäurewerte gegenüber den normalen Anfangswerten hier ausgesprochen niedriger waren. Die Abnahme betrug in der 60. Min. im Durchschnitt 27,9 mg pro 100 ccm, was einer Senkung von 28 % entspricht. Der Blut-

Tabelle 1. Die Wirkung von Qu und DNP auf die Blutmilchsäurewerte.

Hund Nr.	Blutmilchsäure in mg/100 ccm vor der Behandlung	Blutmilchsäurewerte in mg/100 ccm nach Behandlung mit						
		Qu 10 mg/kg i. v.			**DNP** 12 mg/kg i. v.		**DNP** + Qu i. v.	
	Mittelwerte	30′	60′	90′	60′	90′	60′	90′
1	78,2	63,0	69,1	63,8	91,0	92,0	76,6	73,0
2	65,1	60,7	61,5	58,1	96,4	88,7	65,6	41,2
3	67,7	51,0	55,5	50,1	96,6	99,8	54,8	45,6
4	58,8	49,2	48,4	50,2	105,4	105,0	59,5	50,0
5	69,2	62,6	68,0	62,6	135,7	143,7	87,9	75,8
6	77,3	59,2	71,7	58,2	115,6	117,4	74,5	90,9
Im Durchschnitt:	**69,4**		**62,4 (-10,1%)**		**106,7 (+53,7%)**		**69,8 (+0,6%)**	

Tabelle 2. Die Wirkung von Pernoctonnarkose (0,04 g/kg) auf die Blutmilchsäurewerte von Hunden.

Hund Nr.	Blutmilchsäurewerte in mg/100 ccm nach der Narkose							
	vor der Narkose Mittelwerte s. Blutmilchsäure	10′	15′	25′	45′	60′	90′	120′
1	31,4	24,8	30,9	28,0	27,4	28,2	31,3	29,1
2	58,1	34,1	27,8	35,3	38,2	38,7	36,3	35,2
3	81,6	49,2	53,1	46,6	46,6	51,3	47,9	47,3
4	88,3	56,7	38,4	44,4	46,3	49,2	48,5	48,5
5	32,1	31,6	35,0	30,8	24,5	35,0	21,9	40,3
6	35,7	35,4	38,5	33,3	33,6	37,3	40,1	38,2
Im Durchschnitt:	**54,5**					**39,9 (- 26%)**		

Tabelle 3. Die Wirkung von Qu auf die Blutmilchsäurewerte an mit Pernocton (0,04 g/kg) narkotisierten Hunden.

Hund Nr.	Blutmilchsäurewerte in mg/100 ccm							
	vor der Narkose und Behandlung Mittelwerte	nach der Behandlung mit **Qu** (10 mg/kg) und nach der Narkose						
		5′	10′	15′	25′	35′	45′	60′
1	24,9	21,4	17,8	23,4	31,3	19,2	20,3	19,8
2	32,9	27,6	31,6	26,6	29,4	22,7	25,4	23,2
3	48,7	43,2	30,5	35,3	30,3	30,2	30,5	28,6
4	54,2	53,4	32,7	37,2	36,0	31,0	41,1	37,0
5	36,7	35,0	29,8	24,5	35,0	22,0	40,3	40,2
6	34,8	39,8	29,4	25,3	28,1	25,2	20,5	18,3
Im Durchschnitt:	**38,7**							**27,9 (- 28%)**

milchsäurewert der mit Pernocton narkotisierten Hunde war also auf Wirkung des Quercitrins in der 60. Min. um 2% mehr niedriger als der der mit Pernocton narkotisierten, aber mit Quercitrin nicht behandelten Tiere.

B. Die Wirkung des Quercitrins und 1 : 2 : 4 α-Dinitrophenols auf die Blutmilchsäurewerte von nicht narkotisierten und narkotisierten Hunden.

Aus den Untersuchungen von A. Mayer [6], Heymans und van Nytvanck [7], Bouckart und sodann Ehrenfest und Ronzoni [8] ist bekannt, daß das DNP und dessen Derivate die Milchsäureproduktion des Organismus

[6] Mayer, A., Plantefol u. Magne: Ann. de Physiol. **7**, 269–273 (1931); LXV, S. 804. [7] Van Nytvanck u. Heymans: Ebenda **7**, 279 (1931); LXV, S. 805. [8] Ehrenfest u. Ronzoni: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **31**, 318, 319 (1933); LXXIX, S. 282.

in hohem Grade zu steigern fähig sind. Deshalb haben wir auch untersucht, ob das Qu auch die Elimination des auf Wirkung des DNP entstandenen Milchsäureplus zu beeinflussen imstande ist? Hierbei mußte in Betracht gezogen werden, daß — wie wir es aus den Untersuchungen von Tainter und Cutting[9] u. a. wissen — sich die Versuchstiere, besonders die Hunde, schon nach der zweiten oder dritten Behandlung an die DNP-Wirkung stark gewöhnen können. Um die Frage entscheidend klarzulegen, wurde der Quercitrin-Dinitrophenol-Antagonismus aus dem Gesichtspunkte der Milchsäureproduktion, ähnlich wie in unseren vorigen Untersuchungen[2, 3], auch in dieser Versuchsreihe bei solchen Tieren ausprobiert, welche vor dem Versuch noch kein DNP bekommen haben. Wir gingen von der Vorstellung aus, daß die die Milchsäureproduktion fördernde Wirkung des zum zweiten Male ohne Qu verabreichten DNP bei demselben Tiere auch so höher sein wird als nach der gleichzeitigen Anwendung des DNP und Qu. So müßten wir aber damit rechnen, daß die DNP-Wirkung weniger ausgesprochen sein wird, als wenn wir demselben Tier das DNP zuerst allein gegeben hätten.

Diese Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4. Die Wirkung von Qu und DNP auf die Blutmilchsäurewerte an mit Pernocton (0,04 g/kg) narkotisierten Hunden.

Hund Nr.	Blutmilchsäurewerte in mg/100 ccm							
	nach Beginn der Narkose	nach Behandlung mit **Qu** (10 mg/kg) und **DNP** (12 mg/kg) i. v.						
	10′	5′	10′	15′	25′	45′	60′	90′
1	24,5	26,2	25,3	30,2	31,0	27,2	32,8	34,6
2	34,6	38,2	38,4	31,2	39,6	34,2	32,1	39,9
3	51,3	49,2	44,7	48,7	47,3	41,3	54,6	59,3
4	57,9	55,0	43,7	47,8	46,4	44,6	51,8	77.3
5	33,8	31,7	32,6	22,5	24,1	27,3	28,2	26,1
6	34,2	30,6	33,0	30,8	42,3	40,5	46,3	39,3
Im Durchschnitt:	**39.3**						**46,1 (+ 1,7 %)**	

Aus den Tabellen können wir sehen, daß bei gleichzeitiger Anwendung von Qu und DNP der Blutmilchsäurewert der nicht narkotisierten Tiere 69,8 mg pro 100 ccm war, was einer Steigerung von + 0,6 % entspricht und der Milchsäurewert der narkotisierten Tiere im Durchschnitt bei den 6 Tieren 46,1 mg pro 100 ccm ergab, was gegenüber den Anfangswerten eine Zunahme von + 1,7 % bedeutet.

[9] Tainter u. Cutting: J. Pharmacol. (Am.) **49**, 187 (1933); LXXVIII, S. 335.

C. Die Wirkung des Dinitrophenols auf die Blutmilchsäurewerte von nicht narkotisierten und narkotisierten Tieren.

Diese Versuche wurden 1 Woche nach gleichzeitiger Behandlung der Tiere mit Qu und DNP durchgeführt.

Der Blutmilchsäurewert der nicht narkotisierten Tiere (s. Tabelle 1) zeigte 60 Min. nach der DNP-Behandlung im Durchschnitt eine Erhöhung von 106,7 mg pro 100 ccm, also durchschnittlich + 53,7 %. Es sei bemerkt, daß das Blut der wachgehaltenen Tiere aus den schon erwähnten Gründen schon am Anfang höhere Werte aufwies.

Der Blutmilchsäurewert der mit Pernocton narkotisierten Tiere war 10 Min. nach dem Beginn der Narkose bedeutend niedriger als der der nicht narkotisierten Tiere. Der Befund ergab im Durchschnitt 37,1 mg pro 100 ccm. Nach i. v. Injizierung von 12 mg/kg DNP stieg dieser Wert durchschnittlich bis 82,6 mg pro 100 ccm an. Diese Steigerung ist in absolutem Sinne genommen gegenüber den Werten der nicht narkotisierten Tiere nicht groß, bedeutet aber doch eine Zunahme von 122 %. Diese auffallende Steigerung kann teilweise damit erklärt werden, daß der anfängliche Blutmilchsäurewert bei den narkotisierten Tieren viel niedriger ist als bei den nicht narkotisierten.

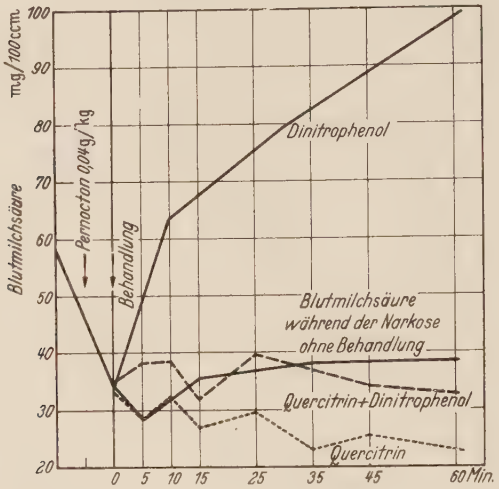
Tabelle 5. Die Wirkung von DNP auf die Blutmilchsäurewerte an mit Pernocton (0,04 g/kg) narkotisierten Hunden.

Hund Nr.	Blutmilchsäurewerte in mg/100 ccm			
	nach Beginn der Narkose mit	nach Behandlung mit **DNP** (12 mg/kg) i. v.		
	10′	10′	30′	60′
1	25,2	52,7	76,4	86,4
2	33,4	63,1	84,2	103,7
3	45,8	55,5	60,7	73,5
4	53,5	58,3	69,0	81,5
5	32,7	38.2	45,5	59,0
6	31,9	45,3	52,4	91,8
Im Durchschnitt:	**37,1**			**82,6 (+ 122 %)**

Während das allein verabreichte DNP einen so hohen Milchsäurewert zur Folge hatte, konnte eine solche Wirkung desselben bei gleichzeitiger Injizierung des Flavonglykosids — wie wir das sehen konnten — nicht beobachtet werden. Der Blutmilchsäurewert war in dieser Versuchsreihe durchschnittlich 46,1 mg pro 100 ccm, d. h. er zeigte in der 60. Min. eine Steigerung von nur 1,7 %.

Zwecks klarer Übersicht der Ergebnisse sind die Veränderungen des Blutmilchsäurewertes des einen Tieres auf Wirkung von Qu, sodann Qu + DNP und schließlich DNP dargestellt (s. Tabelle 6).

Tabelle 6. Versuche mit Hund Nr. 2.



Diskussion.

Die Versuchsergebnisse zusammenfassend, kann festgestellt werden, daß das Blutmilchsäureniveau des Hundes sowohl in gesundem Ruhezustand wie bei DNP-Vergiftung durch Qu erniedrigt werden kann. Vorliegende Versuchsangaben stehen in Einklang mit den in unserem Institut bezüglich dieser Frage[1,2,3] früher gewonnenen Befunden. Die Milchsäureelimination kann im Organismus auf Wirkung des Qu auf zweierlei Arten zustande kommen: entweder ist der Oxydationsprozeß der Milchsäure in solchem Falle gesteigert oder die Resynthese der Milchsäure zu Glykogen auf irgendeine Weise erleichtert. Bezüglich der ersten Annahme können wir sagen, daß das raschere Verschwinden der Milchsäure auf Wirkung des Qu einfach infolge gesteigerter Oxydation derselben nicht wahrscheinlich ist. Die an lebenden Tieren durchgeführten respiratorischen Stoffwechselversuche zeigen — wie erwähnt[2] —, daß der Atmungsstoffwechsel durch Qu nicht gesteigert wird. Wir konnten auch in unseren bisherigen, mit der Warburgschen Methode durchgeführten Gewebe-Atmungsversuchen sehen, daß, gegenüber dem Kontrollversuch, der Oxygenverbrauch des zum Gewebsbrei zugefügten Natriumlactats durch Qu nicht gesteigert wird. Für wahrscheinlicher muß demnach unsere zweite Annahme angenommen werden und zwar, daß das erwähnte Flavonglykosid die Glykogenresynthese aus Milchsäure auf irgendeine Weise zu fördern imstande ist. Wir werden uns bemühen, diese unsere Annahme in weiteren Versuchen zu untersuchen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Pázmány Péter-Universität zu Budapest.

Über die Pharmakologie der gefäßverengernden Stoffe der Blutseren.

III. Herstellung wirksamer Extrakte aus Katzenserum und einige Eigenschaften derselben.

Von

Alexander Simon.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Dezember 1939.)

Wie in diesem Archiv schon mehrfach berichtet wurde, gelang es Simon zu zeigen, daß, gemessen am Blutdruck der dekapitierten Ratte, 7–24 Stunden altes Serum verschiedener Säugetiere blutdrucksteigernd wirkt[1]. Jedoch kann nach seiner Meinung die Blutdruckwirkung der verschiedenen Seren von Säugern nicht von demselben Stoff herrühren. Die Blutdruckwirkung des Katzen-, Kaninchen-, Schweine- und Ochsenserums war adrenalinähnlich und der wirksame Stoff dialysierbar. Menschen-, Hunde- und Pferdeserum wirkten dagegen dem Adrenalin unähnlich blutdrucksteigernd und der wirksame Stoff konnte nicht dialysiert werden. Des weiteren gelang es, aus frischem, ungeronnenem Katzen- und Kaninchenblut einen alkoholischen Auszug zu bereiten, dessen Blutdruckwirkung mit der des 7—24 Stunden alten Serums übereinstimmte[2].

In dieser Arbeit berichten wir über die Herstellung wirksamer Auszüge aus adrenalinähnlich wirkenden Seren und über einige Eigenschaften derselben. Es stellte sich bald heraus, daß unsere erste Prozedur unstete Ergebnisse lieferte. Diese bestand aus Schütteln des Serums mit Äthylalkohol für eine Stunde und Stehenlassen für eine Nacht; Abnutschung des Niederschlages, Einengen des Filtrats in Vacuo, Aufnahme des Rückstandes in 96%igem Alkohol, Filtrieren und nach Vertreibung des Alkohols mit Hilfe eines Ventilators, Aufnahme des Rückstandes in physiologischer NaCl Lösung. Am meisten gelang der Versuch mit Katzenserum, so daß zu den weiteren Versuchen wir immer dieses Serums uns bedienten.

Durch Kochen des verdünnten Serums mit Essigsäure war es möglich, wirksamen Auszug herzustellen, doch war dieser noch voll mit Proteinen. Auch durch Enteiweißung mit Trichloressigsäure ist es in mehreren Fällen gelungen, blutdrucksteigernde Auszüge herzustellen. Der Gang der Extraktherstellung war der folgende: 10—30 ccm Serum wurden mit der doppelten

[1] Simon, A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 273 (1938); **187**, 678 (1937). — [2] Simon, A., u. E. Komlós: Ebenda **192**, 701 (1939).

Menge Aqua destillata verdünnt und pro ccm unverdünntes Serum 1 ccm 12%ige Trichloressigsäurelösung und einige Tropfen Amylalkohol zugesetzt. Nach einer Viertelstunde wurde abgenutscht, das Filtrat in Vacuo bei 45° C auf ungefähr 20 ccm eingeengt. Die noch vorhandene Trichloressigsäure wurde durch Schütteln mit Äther im Scheidetrichter entfernt und die Einengung im Vacuo bis zur Trockene fortgesetzt. Der Rückstand wurde in 96%igen Alkohol aufgenommen. Nach Filtrierung wurde der Alkohol mit Hilfe eines Ventilators verjagt, der Trockenrückstand in 2—4 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und wenn nötig neutralisiert. Die blutdrucksteigernde Wirkung dieser Extrakte war schwächer als die zum Ausgangspunkt dienenden Seren. Zuweilen riefen solche Auszüge Blutdruckerniedrigung hervor.

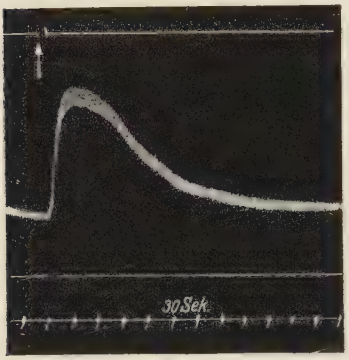


Abb. 1. Blutdruck der dekapitierten Ratte. Beim Pfeil 0,4 ccm Katzenserumextrakt.

Es wurde auch gefunden, daß durch Schütteln des Serums mit Tierkohle Merck und nachheriger Abfiltrierung die Blutdruckwirkung solchen Serums viel kleiner wurde. Der wirksame Stoff wurde wahrscheinlich durch Adsorption an die Kohle gebunden. Versuche, den adsorbierten Stoff mit kaltem oder warmem Alkohol, mit Wasser von verschiedenem p_H, mit Eisessig, n/10 NaOH, mit gesättigter NaCl-Lösung eluieren, endeten ohne Erfolg. Als interessante Tatsache möchten wir hervorheben, daß durch Schütteln des Hundeserums mit Tierkohle, welches Serum, wie schon bemerkt, einen anderen blutdrucksteigernden Stoff als das Katzenserum enthält, die Blutdruckwirkung dieses Serums nicht verändert wird.

Die endgültige Methode, mit deren Hilfe schon seit einem halben Jahre ohne Schwierigkeit immer wirksame Auszüge herzustellen möglich war, war die folgende: 20—50 ccm 7—24 Stunden altes Katzenserum wurden mit der sechsfachen Menge Äthylalkohol im Wasserbade unter Rückflußkühler für 3 Stunden extrahiert. Nach Beendigung der Extraktion wurde das ausgefallene Eiweiß meistens nur am nächsten Tage abgenutscht. Das Filtrat wurde in Vacuo bei 45° C bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 96%igem Äthylalkohol aufgefangen und nach halbstündigem Stehen filtriert. Nach Vertreibung des Alkohols mit Hilfe eines Ventilators wurde der Rückstand in 6—10 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und im Scheidetrichter mit Äther geschüttelt. Die Ätherspuren in der wässerigen Lösung wurden verjagt und die verbleibende Lösung auf das Originalvolumen ergänzt.

Solche Auszüge, wie auch Abb. 1 zeigt, übten auf den Blutdruck der dekapitierten Ratte immer eine starke steigernde Wirkung aus. Immerhin

arbeitete auch diese Methode mit großen Verlusten, welcher besonders dann auffällig war, wenn man anstatt von 20—50 ccm Serummenge aus 200 bis 300 ccm den Auszug herstellte. Diese Extrakte waren kaum wirksamer als die aus 50 ccm Serum bereiteten.

Statt Äthylalkohol wurden auch mit Methylalkohol ebensogute Ergebnisse erhalten.

Diese Auszüge waren auch nach Kochen für 1 Stunde im Wasserbade vollständig wirksam. Die Wirksamkeit von 1,0 ccm Extrakt verliert sich in den meisten Fällen vollkommen, wenn man es mit 0,1 ccm 1 n NaOH 15 Minuten lang auf siedendem Wasserbade erwärmt. 0,1 ccm 1 n HCl zu 1,0 ccm Extrakt und Kochen für dieselbe Zeit schadete der Wirksamkeit überhaupt nicht. Der wirksame Stoff ist unlöslich in Äther, dagegen löslich in Äthyl- und Methylalkohol. Im Eisschrank aufbewahrt, waren 2 Wochen alte Extrakte noch gut wirksam.

Ebenso wie die Wirkung des Katzenserums ist auch die des Extraktes durch Cocain sensibilisierbar und durch Ergotamin umkehrbar.

Während diese letzten Eigenschaften des Auszuges stark denen des Adrenalins ähnelten, fand man bei der näheren Untersuchung 2 Unterschiede.

Der erste betrifft das verschiedentliche Verhalten des Auszuges von dem des Adrenalins nach Durchperlen mit Oxygen. Wenn man z. B. 1,5 ccm Serumextrakt mit 10 γ Adrenalin versetzt und diese Lösung für 4–6 Stunden lang mit Oxygen durchperlen läßt, wirkt 0,1 ccm dieser Flüssigkeit auf den Blutdruck sehr schwach, obzwar vor dem Durchperlen das in dieser Menge vorhandene Adrenalin stark wirksam war. Durchperlen des Extraktes mit Oxygen für dieselbe Zeit schadet dagegen der Wirksamkeit des Serumauszuges überhaupt nicht. Wenn z. B., wie in Abb. 2, 0,5 ccm vor dem Durchperlen stark wirksam waren, erhielt man mit derselben Menge auch nach dem Durchperlen denselben Effekt. (Das Adrenalin wurde im Serumextrakt anstatt von physiologischer NaCl-Lösung gelöst — worin, wie schon O'Connor[3] gezeigt hatte, es durch Oxygen zerstört wird —, um möglichst ähnliche Verhältnisse betreffend dem Adrenalin und dem unbekannten verengernden Stoff herzustellen.)

Der zweite Unterschied betrifft das Verhalten der Blutdrucksteigerung nach Cocaingabe. Wenn man solche Adrenalindosen und Serumgaben heraussucht, die am Blutdruck der dekapitierten Ratte annähernd gleich große Steigerung bewirken, so fand man eindeutig, daß nach Cocainzufuhr die sensibilisierende Wirkung für das Adrenalin und für den verengernden Stoff des Serums nicht dieselbe ist. Während die vergrößerte Blutdruckwirkung des Extraktes auch nach mehreren Extraktgaben annähernd die gleiche blieb, verkleinerte sich oder verschwand die vergrößerte Adrenalin-

[3] O'Connor: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **167**, 95 (1912).

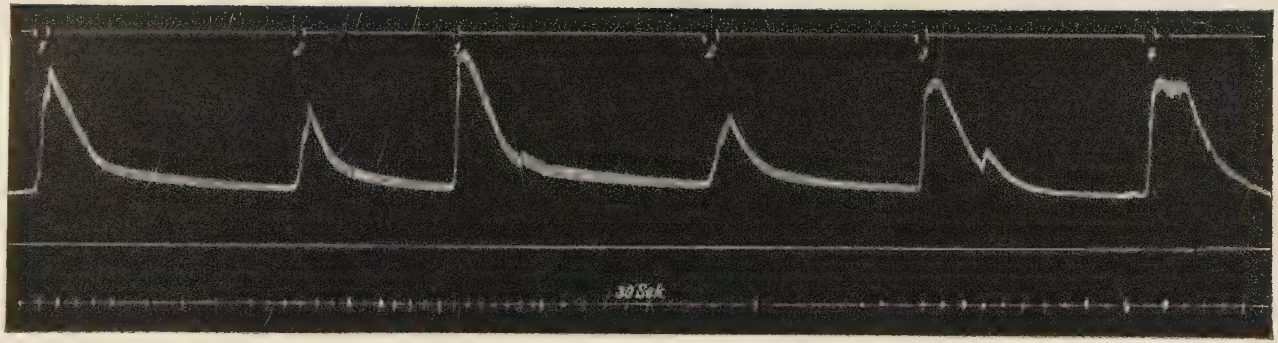


Abb. 2. Blutdruck der dekapitierten Ratte. Bei 1: 0,1 ccm einer Mischung, hergestellt aus 1,5 ccm Serumextrakt + 10 γ Adrenalin ohne Oxygendurchperlen. Bei 2: Dieselbe wie bei 1 aber nach Durchperlen mit Oxygen für 5 Stunden. Bei 3: 0,5 ccm Serumextrakt. Bei 4: 0,5 ccm Serumextrakt nach Durchperlen mit Oxygen für 5 Stunden.

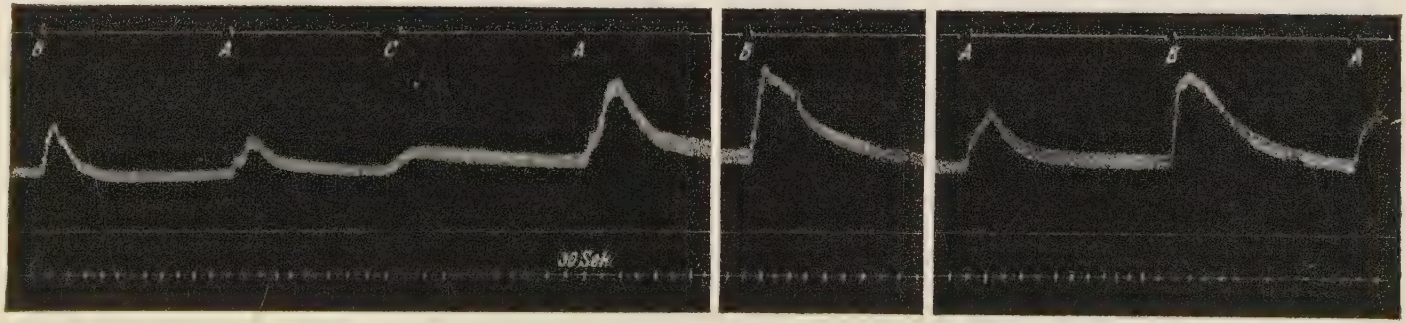


Abb. 3. Blutdruck der dekapitierten Ratte. Bei A: 0,2 γ Adrenalin. Bei B: 0,25 ccm Serumextrakt. Bei C: 0,2 mg Cocain hydrochloricum.

wirkung schon nach einigen Injektionen. Dieses Verhalten ist typisch am Blutdruck der dekapitierten Ratte (Abb. 3).

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung von Phenoloxydase enthaltenden Flüssigkeiten auf Blutserumauszüge geprüft. Das Ferment wurde nach Angaben von Szent-Györgyi mit unbedeutenden Modifizierungen aus den Randteilen junger Kartoffeln hergestellt[4]. Auspressen im Überdruck wurde nicht angewendet. Der Alkohol wurde einfach abgenutscht und der gut zusammengepreßte Rückstand einige Minuten lang vor einem Ventilator getrocknet. 7 g Kartoffelrückstand wurden mit 50 ccm physiologischer NaCl-Lösung versetzt und einige Stunden stehengelassen. Das Filtrat dieser Gemenge diente als Fermentlösung. Nicht ein

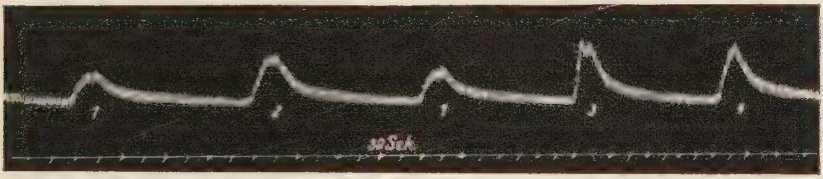


Abb. 4. Blutdruck der dekapitierten Ratte. Bei 1: 0,5 ccm Serumextrakt + Fermentlösung nach Einwirkung von 4 Stunden. Bei 2: 0,5 ccm Serumextrakt + gekochte Fermentlösung. Bei 3: 0,5 ccm Serumextrakt. Bei 4: 0,5 ccm Serumextrakt + ungekochte Fermentlösung unmittelbar nach dem Vermischen.

jedes Fermentpräparat war wirksam. 2 ccm Serumextrakt wurden im allgemeinen mit 0.5 ccm Fermentlösung versetzt und nach Ablauf von 4 bis 5 Stunden die Wirkung solcher Gemische am Blutdruck der dekapitierten Ratte untersucht.

In der Mehrheit der Versuche war die Blutdruckwirkung dieser Mischung kleiner als die der entsprechenden Menge Serumextrakt ohne Fermentlösung, oder erhielt man überhaupt keine Blutdruckerhöhung. Zuweilen verursachte die Injektion der Fermentlösung allein Blutdrucksenkung. Wenn dies der Fall war, wurde die Verkleinerung der Blutdrucksteigerung nach Ferment — Extraktgabe nicht als Fermentwirkung verwertet. 10 Minuten lang gekochte Fermentlösungen bewirkten keine Verminderung der Blutdruckwirkung des Serumauszuges. Abb. 4 zeigt ein typisches Beispiel dieser Versuche.

Nach den Angaben von Richter[5] hemmt m/1000 Natriumsulfit die Wirkung der Phenoloxydase auf Monophenole, während die Fermentwirkung auf Brenzkatechin unverändert bleibt.

In fünf Versuchen wurden Serumextrakt-Fermentansätze auch mit Natriumsulfit versetzt. In all diesen Versuchen war die Blutdruckwirkung dieser Ansätze ausgesprochen größer als die der Serumextrakt-Fermentansätze allein. Jedoch erreichte sie jene des Serumextraktes im allgemeinen nicht. m 1000 Natriumsulfit in physiologischer NaCl-Lösung übte allein auf den Blutdruck keine Wirkung.

[4] Szent-Györgyi, A.: Biochem. Z. **162**, 399 (1925). — [5] Richter, D.: Biochem. J. **28**, 901 (1937).

Diese letzten Versuche sprechen eher dafür, daß der blutdruckerhöhende Stoff des Serumextraktes wahrscheinlich ein Monophenolderivat ist, obzwar der Grund warum m/1000 Natriumsulfit die Wirkung der Phenoloxydase nicht gänzlich hemmte, nicht zu finden war.

Besprechung.

Aus Katzenserum konnte durch Alkoholextraktion ein Auszug hergestellt werden, dessen Wirkung auf den Blutdruck dieselbe war wie die des Katzenserums. Der gefäßverengernde Stoff ist, wie Simon schon früher zeigte, dialysabel. Er löst sich in Äthylalkohol, in Wasser, ist unlöslich in Äther. In schwacher HCl-Lösung gekocht verliert der Auszug seine Wirksamkeit nicht. Kochen in schwacher NaOH dagegen vernichtet die Blutdruckwirkung. An Tierkohle wird er adsorbiert. Die Wirkung dieses Stoffes auf den Blutdruck der dekapitierten Ratte ähnelt sehr der des Adrenalins. Ebenso wie jene des Adrenalins wird auch diese durch Cocain verstärkt, durch Ergotamin gehemmt.

Der Vorstellung aber, daß dieser Stoff Adrenalin sei, scheinen die folgenden Beobachtungen eher zu widersprechen. 1. Dieser Stoff stammt sehr wahrscheinlich nicht aus den Nebennieren, da nach Exstirpation derselben die gefäßverengernde Wirkung nicht verkleinert wird. 2. Während das Adrenalin im Oxygenstrom seine Wirkung auf den Blutdruck verliert, zeigen Serumauszüge nach Oxygendurchströmung keine Wirkungsverminderung. 3. Die sensibilisierende Wirkung des Cocains für den Serumextrakt dauert viel länger als für das Adrenalin am Blutdruck der dekapitierten Ratte. 4. Obzwar Phenoloxydase der Kartoffel die Serumextraktwirkung auf den Blutdruck hemmt, diese Hemmung ist viel kleiner nach Natriumsulfitzugabe, welche Substanz nur die Fermentwirkung auf Monophenole, nicht auf Pyrokatechinderivate aufhebt.

Diesen Beobachtungen zufolge scheint der blutdruckerhöhende Stoff des Serumextraktes wahrscheinlich ein Monophenolderivat zu sein.

Zusammenfassung.

1. Durch Kochen mit Äthylalkohol läßt sich aus 7–24 Stunden altem Katzenserum ein Extrakt gewinnen, dessen Wirkung am Blutdruck der dekapitierten Ratte ebenso adrenalinähnlich ist wie die des Serums.

2. Der blutdrucksteigernde Stoff solcher Auszüge löst sich in Wasser, in Alkohol, ist dagegen unlöslich in Äther. An Tierkohle wird er adsorbiert. Kochen in schwacher HCl vernichtet die Wirkung nicht, wohl dagegen NaOH unter denselben Umständen. Durch Phenoloxydaselösung wird die Wirksamkeit des Extraktes verkleinert oder vernichtet; Oxygendurchströmung schadet der Wirkung der Auszüge nicht.

3. Die sensibilisierende Wirkung des Cocains für den blutdrucksteigernden Stoff des Katzenserumextraktes dauert viel länger als dieselbe Wirkung für das Adrenalin am Blutdruck der dekapitierten Ratte.

COUNTWAY LIBRARY
HC 6EB5